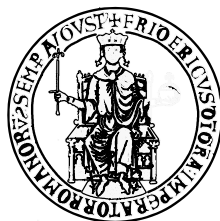


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



FACOLTÀ DI FARMACIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO

XXIII CICLO

**SINTESI E VALUTAZIONE FARMACOLOGICA DI
NUOVI LIGANDI DELLA PROTEINA PRIONICA PER IL
LORO IMPIEGO NEL TRATTAMENTO DELLE
ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI (TSE)**

COORDINATORE

PROF.SSA MARIA VALERIA D'AURIA

TUTORE

PROF. GIUSEPPE CALIENDO

CANDIDATA

DOTT.SSA ANTONELLA ESPOSITO

INDICE	PAGINA
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili.....	4
1.1.1 TSE degli animali.....	5
1.1.2 TSE dell'uomo.....	16
1.2 La Proteina Prionica.....	23
1.3 Teoria Prionica	34
2. IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA.....	41
3. PARTE SPERIMENTALE.....	53
3.1. Procedura generale della sintesi.....	54
3.2 Procedimenti sperimentali della sintesi.....	56
3.2.1 Sintesi dell'intermedio a	56
3.2.2 Sintesi dell'intermedio b	57
3.2.3 Sintesi dell'intermedio c	59
3.2.4 Sintesi dell'intermedio d	60
3.2.5 Sintesi dei composti finali 1-34	61
3.3 Caratterizzazione dei composti 1-34	62
3.4 Materiali.....	88
4. FARMACOLOGIA.....	90
4.1 SIFT (<i>Scanning for Intensely Fluorescent Targets</i>).....	91
4.1.1 Materiali e metodi per il saggio SIFT.....	94
4.2 Inibizione dell'accumulo di PrP ^{Sc} in modelli cellulari.....	97
5. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	100
BIBLIOGRAFIA	118

1. INTRODUZIONE

1.1 Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili

Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili o TSE (*Transmissible Spongiform Encephalopathies*) comprendono una serie di differenti stati patologici infettivi, abbastanza simili, che interessano alcune specie animali, in particolare i mammiferi, tra cui l'uomo (1). Tali patologie, generalmente caratterizzate da un periodo più o meno lungo di incubazione, durante il quale la malattia è difficilmente dimostrabile, e da una lenta e progressiva neurodegenerazione, sono tutte letali. La formazione di grossi vacuoli nella corteccia cerebrale e nel cervelletto, chiaramente evidenziabili *post mortem* nel corso di indagini istopatologiche, conferisce ai suddetti tessuti un aspetto spugnoso (*Status Spongiosus*, Fig. 1). Le modificazioni anatomo-patologiche sono confinate nel sistema nervoso centrale. Si ha un'anomala proliferazione degli astrociti e una riduzione, nei neuroni, dei dendriti implicati nella trasmissione degli impulsi nervosi. Inoltre, in molti casi si osservano placche amiloidi, depositi di materiale con struttura fibrillare, i quali, però, non sembrano essere una caratteristica costante o necessaria di questi stati patologici (2).

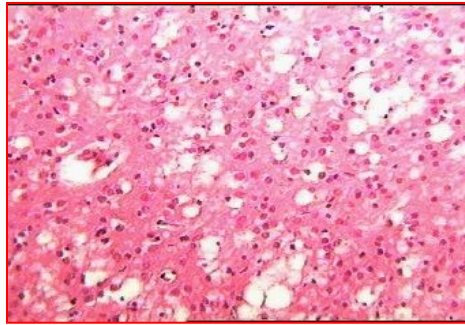


Figura 1. Lesioni anatomo-istopatologiche encefaliche (*status spongiosus*) di bovino affetto da BSE.

Tutte queste malattie, che possono essere latenti anche per decenni, sono accomunate dalla presenza di una proteina specifica, il Prione (*Proteinaceous Infectious Particle* o Entità Proteica Infettante), che normalmente presente nell'organismo, diventa all'improvviso infettiva e svolge un ruolo cruciale nella patogenesi, essendo responsabile dello sviluppo delle lesioni degenerative. Per definire tali patologie, si parla infatti di malattie da prioni, o anche amiloidosi cerebrali.

1.1.1 TSE degli animali

Negli animali le più comuni forme di TSE sono rappresentate da:

- *Scrapie* della pecora, della capra e del muflone;
- Encefalopatia trasmissibile del visone (TME o *Transmissible mink Encephalopathy*);

- Malattia del dimagrimento cronico del cervo (CWD o *Chronic wasting disease*);
- Encefalopatia spongiforme bovina (BSE o *Bovine Spongiform Encephalopathy*);
- Encefalopatia spongiforme dei bovidi selvatici;
- Encefalopatia spongiforme del gatto e dei felidi (FSE o *Feline Spogiform Encephalopathy*).

Lo *Scrapie*, o virosi nervosa degenerativa della pecora, è una malattia degenerativa neurologica che colpisce gli ovini, i caprini e più recentemente i mufloni. Essa può essere trasmessa ad una varietà di mammiferi comprendenti topi e criceti. È clinicamente identificata per lo più in animali di età compresa tra i due e i cinque anni, anche se il periodo di incubazione può raggiungere i dieci anni. Gli animali colpiti perdono la coordinazione dei movimenti, diventano incapaci di reggersi sulle zampe, e infine sopraggiunge la morte. Inoltre, soffrono di un prurito così intenso da indurli a raschiar via parti del mantello (dall'inglese *to scrape*, cioè grattare).

Relativamente alla patogenesi, è stato dimostrato sperimentalmente che il prione presenta un particolare tropismo per i

tessuti linfoidei, ove si replica in una prima fase del periodo di incubazione. Solo in un secondo momento invade il SNC. Le lesioni istopatologiche coinvolgono per lo più il tronco encefalico caudale, benchè nella capra si estendano anche al diencefalo e alla corteccia cerebrale.

Questa patologia viene descritta per la prima volta nel 1755, in Inghilterra, ma è rimasta un'oscura malattia veterinaria fino al 1959, quando è stata posta in relazione con un'altra malattia abbastanza simile, riscontrata nell'uomo nel 1957, cioè il *Kuru*; ciò ha dato impulso alle ricerche, e così lo *scrapie* è oggi considerato il capostipite e il prototipo di quel gruppo di patologie che negli anni sessanta ebbero l'appellativo di encefalopatie spongiformi trasmissibili (23).

L'encefalopatia trasmissibile dei visoni o TME, diagnosticata per la prima volta nel 1947, fu descritta più accuratamente nel 1965. Si tratta di un disordine neurologico debilitante del visone adulto, caratterizzato da atassia, progressiva sonnolenza, debilitazione e morte, in tempi variabili da otto a dodici mesi. Anch'essa ha un periodo di incubazione piuttosto lungo, valutabile in circa sei mesi. Istopatologicamente, l'encefalo presenta le classiche lesioni spongiformi, localizzate

soprattutto al livello della corteccia cerebrale, sede primaria anche delle lesioni spongiformi, della degenerazione neuronale e dell'astrocitosi (in particolar modo i lobi frontali) (24).

La malattia del deperimento cronico del cervo, o CWD, fu descritta per la prima volta nel 1967 in un cervo mulo ed in un ibrido cervo mulo/cervo a coda bianca. Questa patologia colpisce i cervidi adulti di età compresa fra i tre ed i cinque anni, i quali vanno incontro inesorabilmente alla morte, in un periodo variabile da due settimane a otto mesi. Clinicamente è caratterizzata da indebolimento, cambiamenti comportamentali, eccessiva salivazione, polidipsia e poliuria. Indagini microscopiche evidenziano una serie di vacuoli all'interno della corteccia cerebrale degli animali ammalati e deceduti, i quali rendono questo tessuto simile ad una spugna. Inoltre si nota che non vi sono segni di infiammazione o di risposta del sistema immunitario dell'animale, sebbene si evidenzino ammassi proteici tra le cellule in degenerazione. Il quadro istopatologico è pertanto molto simile a quello dello *scrapie* (25).

L'Encefalopatia spongiforme bovina o BSE (*Bovine Spongiform Encephalopathy*) è una malattia neurodegenerativa infettiva che colpisce i bovini. Essa si è propagata, in forma epidemica, negli anni settanta,

provocando nel bestiame colpito la perdita di coordinazione ed una condizione di insolita agitazione, di alterazione del comportamento, (da qui il termine “*morbo della mucca pazza*”). Tuttavia, solo nel 1986 tale patologia è stata adeguatamente descritta, e si è compresa l’origine delle epidemie del bestiame, che è stata individuata in un integratore alimentare contenente carne e farina di ossa di ovini contaminata dell’agente dello *scrapie*. L’epidemia si sarebbe velocemente diffusa principalmente per due motivi:

- il riciclaggio di tessuti ovini e bovini contaminati, trasformati in mangimi per il bestiame sotto forma di farine di carne e di ossa, comprendenti anche tessuti nervosi, cervello e interiora;
- i nuovi metodi di produzione di tali farine, in particolare la riduzione della durata del trattamento e l’abbassamento della temperatura.

In passato la procedura per l’ottenimento di farina di carne prevedeva l’uso di solventi, i quali, per essere eliminati dal prodotto finale, richiedevano passaggi ad elevata temperatura in presenza di vapore, che abbassavano drasticamente il potenziale infettivo del prodotto, eliminando l’agente dello *scrapie* accidentalmente presente nel

materiale di partenza (carcasse di pecora). Tra la fine degli anni settanta e l'inizio degli anni ottanta, la crisi energetica e la necessità di abbattere i costi, ha portato a sostanziali modifiche nelle metodiche di estrazione delle proteine dalle carcasse animali. Eliminando l'uso dei solventi, e quindi il concomitante utilizzo di fasi ad elevata temperatura, si è probabilmente contribuito ad innalzare il potenziale infettivo delle farine di carne, utilizzate come supplemento proteico nell'alimentazione dei bovini britannici; mentre, infatti, il procedimento precedente eliminava l'agente dello *scrapie* dall'integratore, quello nuovo non era evidentemente in grado di farlo. I cambiamenti nel metodo di produzione potrebbero aver provocato pertanto, sia la trasmissione ai bovini dell'agente dello *scrapie* della pecora, sia la moltiplicazione e la propagazione di una malattia, precedentemente non identificata, già presente fra i bovini.

Sono principalmente i bovini adulti i più ricettivi e sensibili alla BSE, e l'incidenza è molto più alta fra gli animali da latte che in quelli da carne, probabilmente in relazione alla loro alimentazione più ricca di concentrati. Non sono state invece constatate particolari predisposizioni di razza e di sesso. La malattia colpisce animali di età compresa tra i

ventidue mesi e i diciotto anni, con un picco attorno ai quattro anni; il tempo di incubazione medio è compreso tra quattro e sei anni (non inferiore comunque ai trenta mesi).

Il “*morbo della mucca pazza*” ha analogie con lo *scrapie*, sia dal punto di vista clinico, che all’esame istopatologico del SNC. Si osservano, infatti, modificazioni del comportamento, come apprensione e aggressività, una condizione di insolita agitazione, iperestesia a stimoli tattili e uditivi, incoordinazione dei quarti posteriori, tremori muscolari, digrignamento dei denti, perdita di peso e riduzione della produzione latte. Il prurito non è un sintomo frequente come nello *scrapie*, mentre in entrambi i casi il cervello dell’animale viene bucherellato trasformandosi in una specie di spugna. L’esame istopatologico del SNC, in seguito alla morte dell’animale, evidenzia vacuolizzazione neuronale, gliosi e ipertrofia astrocitaria, oltre che un certo grado di degenerazione e perdita neuronale. Placche amiloidee sono riscontrabili solo nel 5% dei casi (26). Poco studiata per alcuni anni, tale patologia è balzata all’onore delle cronache allorché gli scienziati britannici, nell’ultimo decennio del secolo scorso, hanno posto in relazione la BSE con un’analoga malattia che colpisce l’uomo: la sindrome di *Creutzfeldt-Jacob* o CJD. In

particolare si ipotizza che esista una nuova variante della sindrome di *Creutzfeldt-Jacob* o nvCJD, trasmessa all'uomo attraverso il consumo della carne di mucche infettate dalla BSE (26-30).

Il governo britannico ha vietato nel 1988, l'uso di integratori alimentari di origine animale ed ordinato la distruzione dei capi ammalati o suscettibili di esserlo. Quindi, nel 1989 ha vietato altresì l'impiego nell'alimentazione umana, ed anche per la preparazione dei mangimi, di determinati tessuti (determinate frattaglie di carne bovina, gli SBO: *Specified Bovine Offal*, tra cui il cervello, il midollo spinale, il sistema nervoso periferico), provenienti da bovini di età superiore a sei mesi; nello stesso anno ha varato un piano per evitare che il bestiame potenzialmente infetto andasse al libero consumo.

Sebbene nel mondo scientifico, le caratteristiche e le modalità di trasmissione delle TSE fossero studiate già da tempo, nell'opinione pubblica mondiale “la crisi della mucca pazza” si è diffusa solo a partire dal 1996, quando sono comparsi i primi casi di nvCJD nel Regno Unito, e dopo qualche anno nel resto del mondo (Fig. 2). Da allora e per circa dieci anni, quasi tutti i Paesi hanno vietato immediatamente l'importazione dal Regno Unito di qualsiasi materiale bovino; nella

Comunità Europea è aumentata la sorveglianza alle frontiere, e rigidi controlli sono stati effettuati sui bovini inglesi già presenti sul territorio. Attualmente la situazione è sotto controllo, e il numero di casi di nvCJD si è ridotto notevolmente (circa 220 casi accertati tra il 1995 e il 2010 nel mondo), grazie ad una moratoria internazionale varata dall'Unione Europea che vieta, a partire dal primo gennaio del 2002, in tutti i Paesi dell'Unione, l'utilizzo delle farine di origine animale (con l'eccezione delle farine di pesce), per l'alimentazione di tutti gli animali d'allevamento, cercando di risolvere alla radice il problema.

Purtroppo, negli anni in cui l'utilizzo delle farine di carne, potenzialmente contaminate dall'agente infettivo della BSE, era vietato solo nel Regno Unito (1988), l'esportazione delle medesime in altre nazioni è avvenuta regolarmente, esponendo quindi tutti i paesi che hanno utilizzato le farine incriminate per l'alimentazione degli animali, al rischio di diffondere il morbo nei propri allevamenti, ed il perpetuarsi così dell'epidemia. Per tali motivi, molte persone continuano ad essere preoccupate di potersi un giorno ammalare per aver consumato carne contaminata (26-30).

sottoposti ad eutanasia. I primi sintomi osservabili consistono in modificazioni comportamentali caratterizzate da improvvisa aggressività o timidezza, apprensione, scarsa reazione agli stimoli, ipersalivazione, polifagia e polidipsia. L'esame istopatologico del tessuto cerebrale consente di osservare lesioni caratteristiche, analoghe a quelle delle altre TSE, rivelando con estrema chiarezza una encefalopatia spongiforme.

L'elemento peculiare è la spongiosi della sostanza grigia estesa a tutto il nevrasse, quindi la tipica vacuolizzazione; raramente sono presenti lesioni degenerative dei neuroni o accumuli di amiloide, mentre costanti sono l'astrocitosi e l'astrogliosi. Anche l'infezione dei felini è presumibilmente da attribuire al consumo di carcasse bovine infette, ritenute non idonee per l'uomo, inclusi pezzi di midollo spinale. Inoltre, indagando su altri animali tenuti in cattività, tale patologia è stata diagnosticata in un puma, in un gattopardo, in due tigri ed in un ghepardo. Conseguentemente a ciò, può dirsi che l'encefalopatia spongiforme è anche una malattia dei felini (31).

Le malattie da prioni umane sono più misteriose, ma anch'esse caratterizzate da un lungo periodo di incubazione, sintomatologia di tipo neurologico, decorso clinico progressivo e costantemente fatale, lesioni

di tipo prettamente degenerativo a livello del sistema nervoso centrale; non si rilevano lesioni infiammatorie o risposte immunitarie da parte dell'organismo, mentre è costantemente presente il "Prione", agente eziologico responsabile.

1.1.2. TSE dell'uomo

Nell'uomo sono state descritte finora le seguenti forme di TSE:

- Malattia di *Creutzfeldt-Jakob* (MCJ o CJD - *Creutzfeldt-Jakob Disease*);
- Nuova variante della Malattia di *Creutzfeldt-Jakob* (nvMCJ o nvCJD);
- Malattia di *Gerstmann-Straussler-Scheinker* (GSS);
- *Kuru*;
- Insonnia Familiare Fatale (IFF);
- Sindrome di *Alpers* (o polidistrofia progressiva infantile).

La sindrome di *Creutzfeldt-Jakob* o CJD, è una malattia neurodegenerativa descritta per la prima volta nel 1920 in Germania da H.G.Creutzfeldt, e manifestatasi in una giovane di 22 anni che rapidamente venne condotta alla morte. L'anno successivo altri quattro

casi della stessa malattia furono descritti da A. Jacob. La sindrome è attualmente riscontrata in tutto il mondo ed appare per lo più sporadicamente, dato che ha un'incidenza di un caso accertato su circa un milione di soggetti indenni. La malattia colpisce ugualmente entrambi i sessi, solitamente si manifesta intorno ai 60 anni, con una durata media di circa quattro-cinque mesi, ed è una rara forma di una progressiva demenza presenile, accompagnata dalla perdita di memoria, di coerenza nel parlare e del controllo motorio. In seguito al deperimento organico si ha la paralisi e successivamente la morte, tipicamente a seguito di polmonite (11, 15, 22).

A tutt'oggi sono note due forme patologiche: quella classica denominata CJD, e quella patologica atipica, individuata più recentemente, precisamente descritta nel marzo del 1996, come una nuova e letale variante della CJD, denominata nvCJD (dove nv sta per nuova variante).

La CJD si manifesta come disordini:

1. Sporadici: responsabili dell' 85-90% dei casi diagnosticati in soggetti anziani, aventi un'età media di sessantacinque anni, i quali generalmente muoiono entro quattro-sei mesi dalla

comparsa della malattia; tuttavia alcuni pazienti possono rimanere in vita in uno stato semi-vegetativo per più di due anni (19).

2. Ereditari: (circa il 5-10% dei casi di CJD) in pazienti aventi una storia familiare caratterizzata da trasmissione autosomica dominante. È legata a sette mutazioni puntiformi del gene della proteina prionica (PRNP), di cui la più frequente è quella al codone 200, che comporta la sostituzione dell'acido glutammico con la lisina (14); tuttavia, oltre alle mutazioni puntiformi, sono state descritte delle inserzioni di differente lunghezza (da 48 a 216 paia di basi) del gene PRNP, che sono associate alla CJD familiare (12). In questi pazienti la malattia ha un esordio precoce, una lunga durata, ed una grande eterogeneità clinica, anche tra i soggetti affetti di una stessa famiglia (9, 10, 11).

3. Iatrogeni: (meno del 5% dei casi diagnosticati) derivanti da taluni procedimenti medici nel tentativo di curare altre patologie. Ad esempio, la sindrome può essere trasmessa a seguito di trapianto di cornea, impianto della dura madre o impianto di elettrodi nell'encefalo, trattamento con ormone della

crescita ottenuto da ipofisi umana (prima che fosse disponibile con la tecnologia del DNA ricombinante), uso di strumenti chirurgici contaminati; il quadro clinico è molto omogeneo (2).

Le modalità di trasmissione della malattia naturale rimangono sconosciute; la trasmissione interumana è stata dimostrata solo nei casi iatrogeni. Dai dati raccolti finora, non è stato possibile evidenziare un rischio maggiore di sviluppare la malattia in categorie professionali particolari, come operatori sanitari e personale che lavora a contatto con gli animali (16).

La nvCJD presenta caratteri clinici e neuropatologici propri. Tra le lesioni anatomopatologiche, prevale la presenza di placche estese di sostanza amiloide, identificabili con tecniche immunoistochimiche, non caratteristiche né della forma sporadica, né di quella familiare della malattia di CJD (Fig. 3). La sindrome ha un decorso più prolungato di quello della CJD (in media quattordici mesi contro quattro-cinque mesi), dalla quale si differenzia anche per la comparsa precoce dell'atassia e dei disturbi psichici e del comportamento, che generalmente insorgono in soggetti di età al di sotto di quarant'anni (l'età media dei soggetti ammalati è di ventinove anni), contro i cinquanta-settanta dei pazienti

affetti dalla forma sporadica della CJD. I sintomi di esordio sono rappresentati da disturbi comportamentali, modificazioni della personalità o depressione, tanto che i pazienti vengono spesso seguiti in ambito psichiatrico. Sono frequenti anche disestesie, spesso riferite come dolore localizzato al piede. La maggior parte dei pazienti sviluppa con il progredire della malattia, mioclono e demenza.

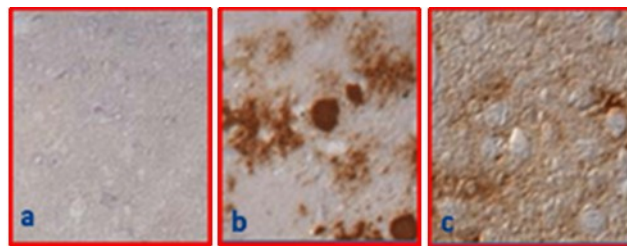


Figura 3. Microfoto di sezioni di cervello umano: **a:** normale, **b:** affetto da CJD, **c:** affetto nvCJD

La comparsa della nvCJD in concomitanza con l'epidemia bovina, ed il fatto che le encefalopatie spongiformi possono essere trasmesse per via alimentare, hanno suggerito che la variante altro non sia che la BSE dei bovini comunicata all'uomo tramite il consumo di carni, stabilendosi, in questo modo, un rapporto epidemiologico tra la BSE e la CJD (17).

La sindrome di *Gerstmann-Straussler-Scheinker* o GSS è un'insolita variante di una malattia del tipo di CJD (10), descritta per la prima volta da J.Gerstmann nel 1928 e riscontrata, entro il 1936 con il contributo di E.Straussler e I.Scheinker, in altri sette soggetti. Questa sindrome, in apparenza molto simile a quella di CJD, differisce da quest'ultima per parecchi e importanti aspetti. Essa è una malattia ereditaria molto rara (è stata calcolata l'incidenza di un caso di GSS su dieci milioni di soggetti sani), caratterizzata da trasmissione autosomica dominante. Generalmente si manifesta con atassia cerebrale e altri sintomi di danno al cervelletto. Tipica è la progressiva demenza, l'assenza di riflessi alle gambe, la formazione di placche amiloidi nel sistema nervoso centrale. La morte, infine, sopraggiunge piuttosto rapidamente dal momento della insorgenza della sindrome.

Le prime descrizioni mediche del *Kuru* sono state pubblicate nel 1957 da V.Zigas e da D.C.Gajdusek (8); essi notarono che molti indigeni della tribù Fore che vive sugli altipiani orientali della Papua Nuova Guinea, venivano colpiti da una strana e letale malattia, caratterizzata da perdita di coordinazione muscolare e spesso, più tardi, da demenza ed infine morte. Gli individui colpiti avevano probabilmente contratto il

Kuru (termine che nel linguaggio Fore significa “tremore”) in seguito a cannibalismo rituale: la suddetta tribù, che chiama il *Kuru* “morte che ride”, usava onorare i defunti mangiandone il cervello, atto di omaggio al parente deceduto. L’incidenza del *Kuru*, che fu riscontrato solo in questa popolazione, è andata però via via diminuendo nel corso degli anni parimenti con l’abbandono di questa pratica, cosicché oggi tale malattia è pressoché scomparsa. Nel 1959 I.Klatzo ha stabilito che il *Kuru* è una malattia che, clinicamente, rassomiglia alla sindrome di CJD.

Il primo caso clinico di *Insonnia familiare fatale*, o IFF, fu descritto nel 1986 da E.Lugaresi e R.Medori dell’Istituto di Neurologia dell’Università di Bologna, a seguito di una ricerca condotta con la collaborazione di P.Gambetti, della *Case Western Reserve University* di Cleveland (13, 14). Tale malattia è caratterizzata da una grave degenerazione neuronale, limitata ai nuclei talamici anteriori e dorsomediali. Generalmente si manifesta in soggetti di età compresa tra trenta e sessant’anni ed ha un decorso medio di tredici mesi. La malattia, di cui si è stabilito il carattere ereditario, si manifesta inizialmente con la difficoltà a prendere sonno e successivamente dà luogo alla demenza.

La *Sindrome di Alpers* (o polidistrofia progressiva infantile) è il nome dato ad una rara malattia dei bambini, descritta da B.J.Alpers nel 1931, che si manifesta con disordini neurologici degenerativi e progressivi caratterizzati da convulsioni, spasmi, contrazioni cloniche di un muscolo o di un gruppo di muscoli (mioclonia), demenza a cui si accompagna itterizia e cirrosi epatica. Istologicamente questa condizione è simile a quella che si registra nella sindrome di *Creutzfeldt-Jacob* (32).

In generale possiamo dire che le malattie da prioni nell'uomo possono presentarsi come:

- Idiopatiche: CJD sporadica; IFF sporadica.
- Genetiche: (Presenza di mutazioni nel gene PRNP), CJD familiare; IFF; GSS; Alpers Sindrome.
- Infettive/Iatrogene: *Kuru*; CJD; nvCJD.

1.2 La Proteina Prionica

Allo stato attuale è noto che l'agente responsabile dello *scrapie* e malattie affini è una proteina, isolata nel 1982, parzialmente resistente alla digestione con proteasi, e che, molto probabilmente, rappresenta il costituente fondamentale, se non l'unico, dell'agente infettivo che è stato

denominato “Prione”, per distinguere questa classe di agenti da virus, batteri, funghi e altri patogeni noti (33, 34).

Indipendentemente dall'esatta natura dell'agente eziologico, i fattori patogeneticamente più importanti sono rappresentati dall'elevata resistenza alla degradazione, dalla mancata risposta immunitaria o infiammatoria da parte dell'organismo e dall'estrema resistenza a numerosi agenti fisici o chimici in grado di inattivare altri microrganismi.

Negli anni sessanta si sono fatti i maggiori progressi nello studio dell'agente causale delle TSE; proprio in tal periodo si è iniziato a capire che esso è estremamente resistente ai trattamenti che inattivano i virus e gli acidi nucleici (come la formalina, le nucleasi, le radiazioni ionizzanti), mentre è inattivato da agenti che distruggono le proteine (come le proteasi, alcuni detergenti, gli acidi forti) (35, 36).

Sulla base dei dati relativi alle procedure in grado di disattivare gli agenti infettivi delle TSE, fu il matematico J.Griffith, che per primo, nel 1967 (37) elaborò l'ipotesi che l'agente causale dello *scrapie* e malattie affini potesse essere una proteina. Successivamente, nel 1982, lavorando su preparazioni infettive di *scrapie*, Stanley Prusiner, dell'Università della California, riuscì a purificare una proteina

parzialmente resistente alla digestione con proteasi, e ipotizzò che essa fosse il costituente fondamentale dell'agente infettivo che egli stesso denominò Prione (1); tal merito gli è valso il premio Nobel per la chimica nel 1997.

Nel 1985, partendo da pezzi di sequenza amminoacidica della proteina, si è riusciti a risalire alla sequenza del gene codificante, che è stato clonato (18). Sorprendentemente, è stato osservato che il prodotto del gene è un normale costituente dell'ospite, una proteina ubiquitaria nei tessuti dei vertebrati, soprattutto, ma non solo, nelle cellule del cervello di tutti i mammiferi, in cui svolge una funzione ancora sconosciuta.

Si è giunti così a riconoscere che esistono due forme di proteina prionica o PrP: la forma normale, PrP^C o PrP^{sen} (dove C sta per “cellula”, e sen sta per “sensibile alle proteasi”) e la forma proteasi-resistente PrP^{Sc} o PrP^{res}, specifica della malattia. Il suffisso Sc per la variante infettiva patologica, fa riferimento alla malattia osservata negli ovini, lo *Scrapie*. Questa macromolecola proteica (PrP^{Sc} o PrP 33-35, ossia dal peso molecolare di 33-35 kDa), se sottoposta all'azione della proteinasi k, cui è sensibile la PrP^C, si degrada parzialmente, perde cioè 67 amminoacidi, diventando PrP 27-30 (5). È proprio quest'ultima che polimerizzando dà

luogo a delle fibrille similamiloidotiche dette SAF (*Scrapie Associated Fibrilis*), a loro volta sono in grado di organizzarsi in placche amiloidotiche, presenti a livello cerebrale in numerose TSE. (Fig. 4).

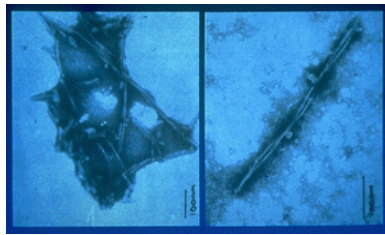


Figura 4. Fibrille semiamiloidotiche – SAF (*Scrapie Associated Fibrilis*).

L'agente eziologico non convenzionale sembra dotato di un particolare tropismo per i tessuti linfoidi, soprattutto la milza, ove presumibilmente si replica durante il periodo di incubazione. Ricerche molto recenti sembrano poi individuare una precoce infezione del tratto distale del piccolo intestino, che precederebbe la localizzazione nervosa. In ogni caso, quasi sicuramente, il processo patogenetico implica una fase di replicazione nei tessuti periferici da cui poi l'agente eziologico raggiunge il SNC. Come e quando l'agente infettante raggiunga il tessuto cerebrale è ancora da definire, sembrano possibili sia la via nervosa, ossia

il prione risalirebbe lungo il midollo spinale o lungo le vie periferiche attraverso i nervi cranici, sia quella ematica (Fig. 5) (38, 39, 40).

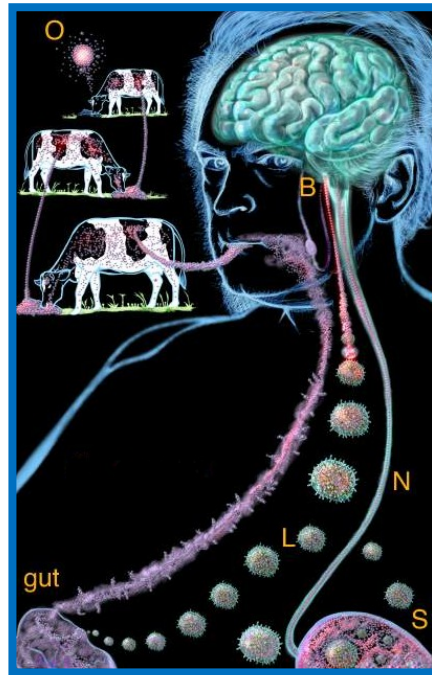


Figura 5. Origine e processo patogenetico della malattia da prioni: “O”: origine della BSE; “B”: trasporto al cervello attraverso il sangue; “gut”: intestino; “N”: nervi; “L”: linfociti; “S”: milza.

Nell’uomo, il gene della PrP^C (PRNP), localizzato nel braccio corto del cromosoma 20, codifica per un peptide che in forma matura ha 254 amminoacidi (9, 21). Le strutture secondaria e terziaria della proteina prionica, dapprima ipotizzate con studi di *modeling*, sono ora note a

seguito di studi di spettroscopia NMR (41, 42) che ne hanno messo in evidenza la caratteristica dicotomia: da una parte la porzione N-terminale (di circa 100 amminoacidi) flessibile; dall'altra la porzione C-terminale altamente strutturata (da circa il residuo 125) grazie alla presenza di tre α -eliche (A, B e C) e due corti β -foglietti antiparalleli (Fig. 6).

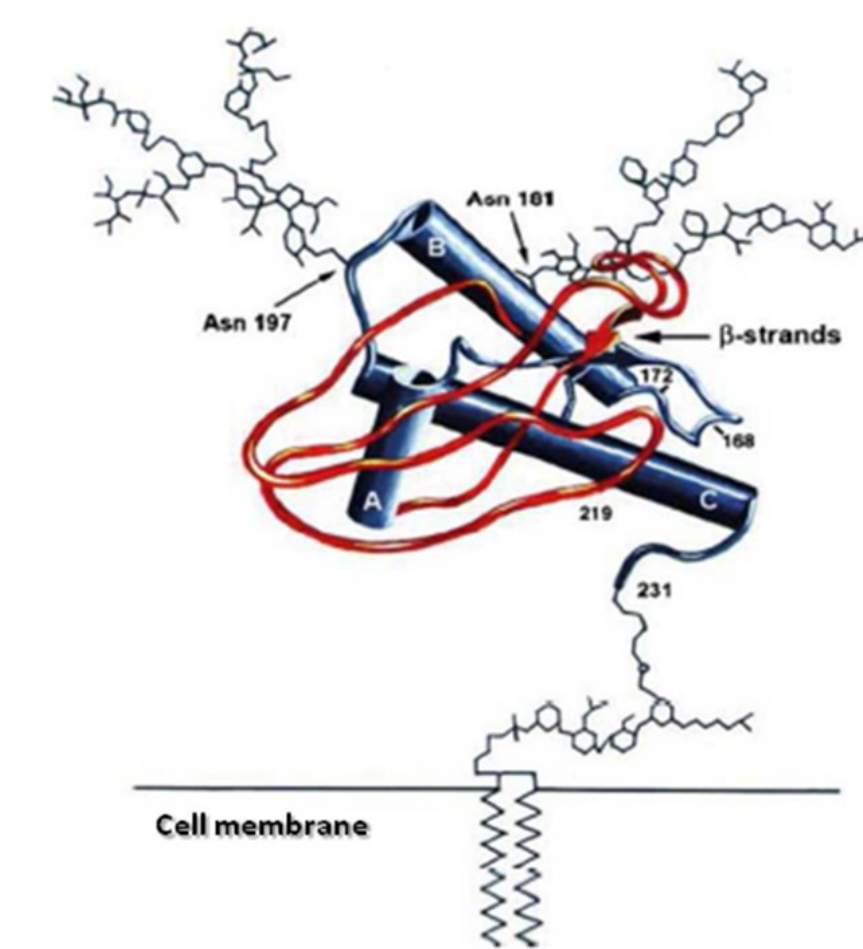


Figura 6. Struttura tridimensionale della PrP^C murina. La proteina matura, che si estende dal residuo 23 al 231, è ancorata al foglietto esterno della membrana plasmatica. La PrP^C contiene due distinti domini conformazionali: il dominio N-terminale, che non possiede una struttura tridimensionale definita, ed il dominio C-terminale altamente strutturato, sia nella forma fisiologica che in quella patologica della proteina. Dall'immagine appaiono evidenti le tre α -eliche (A, B, C) e due siti di glicosilazione.

A livello del terminale carbossilico è presente un'ancora di glicolipidi (GPI: glicosilfosfatidilinositolo Fig. 7), e non sempre, una o due catene laterali oligosaccaridiche. I residui 181 e 197 di asparagina sono glicosilati (CHO) e tra i residui di cisteina 179 e 214 si forma un ponte disolfuro creando un *loop* tra le alfa eliche B e C. Un'altra caratteristica della proteina, che sembra importante ai fini della sua funzione, è la regione delle sequenze ripetute, un dominio funzionale conservato, costituito da una sequenza di otto amminoacidi ripetuta cinque volte, che si estende dal codon 51 al 91 (43, 44, 45).

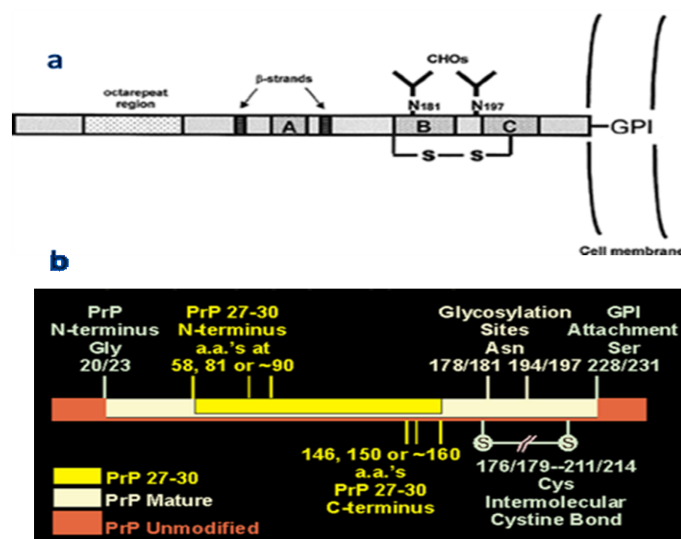


Figura 7. a: rappresentazione schematica della PrP^C. **b:** modifiche post-traslazionali della PrP^C.

La proteina matura si localizza soprattutto a livello della membrana cellulare, dove si attacca tramite l'ancora glicolipidica, e dove, probabilmente, svolge la sua funzione fisiologica. Parte della proteina, però, dopo essere arrivata alla superficie cellulare, torna ciclicamente dentro la cellula dove subisce un taglio, un processo di maturazione al terminale carbossilico ed amminico, che porta, sia per la PrP^C sia per la PrP^{Sc}, ad una proteina di 209 amminoacidi. In seguito, una parte della proteina troncata torna in superficie, mentre l'altra raggiunge gli endosomi ed i lisosomi, che la degradano.

Nonostante le più alte concentrazioni di PrP^C siano associate alle cellule nervose, questa è presente anche a livello di numerosi tessuti (cervello, milza, intestino, fegato, rene, polmoni, pancreas, testicoli, leucociti, piastrine) ed anche nelle giunzioni neuromuscolari (40).

La funzione fisiologica della PrP^C è ignota; finora le ricerche hanno dato risultati frammentari e non conclusivi. Il più importante è stato ottenuto dal gruppo di Charles Weissmann, dell'Università di Zurigo, che ha mostrato che i topi transgenici che non esprimono la proteina prionica si sviluppano normalmente e non mostrano deficit comportamentali significativi (21). La proteina, quindi, o non è

fondamentale per lo sviluppo e le funzioni del cervello o è, viceversa, così importante che esistono altre proteine in grado di compensarne la mancanza. Tuttavia è presente con strutture molto simili in animali zoologicamente molto diversi e sembra essere coinvolta nei meccanismi di riconoscimento o comunicazione intercellulare (46-49). Studiando l'elettrofisiologia dell'ippocampo in questi animali, è stato inoltre scoperto che essi presentavano un deficit della trasmissione sinaptica mediata da recettori per il neurotrasmettitore GABA. Quest'ultimo risultato, tuttavia, rimane controverso, in quanto altri ricercatori non sono riusciti a riprodurlo (50, 51).

Molti sono gli studi, attualmente in corso, finalizzati a chiarire quale possa essere la funzione principale di questa proteina nell'organismo. Alcune evidenze sperimentali dimostrano che sia coinvolta nei ritmi circadiani, infatti, studiando il sonno in topi transgenici ed in controlli normali, è stata osservata una differenza nella durata del periodo di attività motoria giornaliera e nell'adattamento alla privazione di sonno (52). Altri gruppi di ricerca hanno poi dimostrato che la PrP^C potrebbe avere un ruolo come trasportatore del rame all'interno della cellula (53, 54). In seguito si è scoperto che la proteina è espressa in

alte concentrazioni nelle sinapsi, e che le cellule che ne sono prive sono più sensibili a vari tipi di stress (55).

Restano da approfondire molti dettagli, ma un aspetto sembra chiaro: la principale differenza fra la PrP normale e quella dello *scrapie* è esclusivamente conformazionale, cioè si differenziano esclusivamente per il modo in cui la catena degli amminoacidi si ripiega.

Utilizzando modelli molecolari per cercare di ricostruire la struttura della proteina normale, si è concluso che quest'ultima, probabilmente, si avvolge in una struttura compatta avente un dominio “globulare”, in cui la catena di amminoacidi forma tre strutture avvolte ad α -elica. L'isoforma che provoca lo *scrapie* contiene invece filamenti β , ossia regioni dove lo scheletro proteico è completamente disteso. Nella PrP^C, il dominio globulare, così come il resto della molecola, può essere “digerito” dalle proteasi, cosa che non è possibile per un segmento analogo di PrP^{Sc}, perché, come detto, la forma patologica contiene dei foglietti β , nei quali la catena di amminoacidi ha un andamento paragonabile ad una lamiera ondulata (3, 4). In tal caso, gli enzimi possono scindere solo l'estremità aperta della catena (Fig. 8).

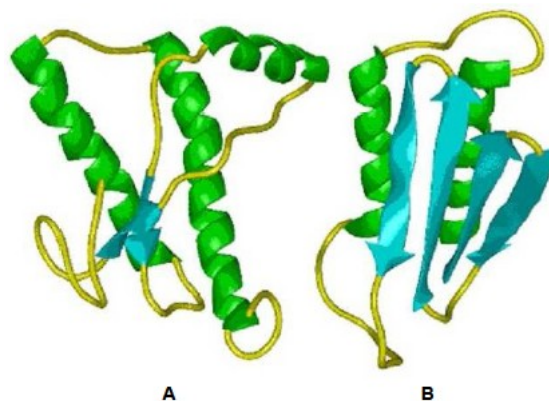


Figura 8. Rappresentazione tridimensionale della struttura secondaria e terziaria di PrP^C (A) e dell'isoforma patogena PrP^{Sc} (B). In verde sono riportate le α -eliche, in azzurro i foglietti β ; in giallo le regioni non strutturate. Si può osservare il notevole aumento di strutture β nella PrP^{Sc} rispetto alla PrP^C.

1.3. Teoria Prionica

L'ipotesi attualmente più accreditata, circa le basi molecolari della malattia da prioni, sostiene che, l'agente proteico, prodotto nelle cellule di tutti i mammiferi attraverso la normale sintesi proteica, pur essendo privo di acidi nucleici, è in grado di trasformarsi in una isoforma non correttamente ripiegata, la quale si accumula nel cervello degli individui ammalati. Questa ipotesi pioneristica, formulata dal virologo

statunitense Stanley Prusiner, venne chiamata "*protein-only hypothesis*" o "*teoria prionica*" e si basa sostanzialmente su due modelli (7).

Il primo modello, il "*refolding*" o "*template-assistance*", ipotizza un'interazione tra la proteina prionica "infettiva" esogena, cioè introdotta dall'esterno, PrP^{Sc}, e la proteina prionica normale endogena PrP^C, che in seguito a questo contatto verrebbe indotta a trasformarsi nella PrP^{Sc}. Si formerebbe perciò una molecola eterodimerica costituita da due subunità, e ciò determinerebbe la deformazione della PrP normale; alla rottura del dimero seguirebbe la liberazione di due molecole alterate.

Il secondo modello, chiamato "*seeding*" o "*nucleation-polymerization*", ipotizza invece che PrP^C e PrP^{Sc} esistano nel nostro organismo in un equilibrio termodinamico reversibile. Il reclutamento e l'aggregazione in fibrille amiloidi di forme monomeriche di PrP^{Sc} avverrebbe solo quando diverse molecole di PrP^{Sc}, per motivi ancora sconosciuti, si organizzano in strutture altamente ordinate e quindi interagiscono insieme con una molecola sana, causandone la deformazione strutturale. Questo cambiamento darebbe origine ad una reazione a catena in cui le molecole appena trasformate modificano la

forma di altre molecole normali di PrP e così via, in un processo autocatalitico, responsabile della produzione massiva di PrP^{Sc} (Fig. 9).

Nel modello della polimerizzazione nucleata, PrP^{Sc} diviene stabile all'interno di questa struttura simil-cristallina; la frammentazione di aggregati di PrP^{Sc} può però aumentare il numero di nuclei di cristallizzazione, i quali possono reclutare altre PrP^{Sc} e portare ad una apparente replicazione dell'agente prionico (6), che conduce inesorabilmente alla morte delle cellule nervose che lo contengono (degenerazione spongiforme del cervello). A dimostrazione di ciò, sono stati fatti studi su topi mancanti del gene per la PrP, non presentanti alcuna anomalia individuabile, ottenuti con tecniche di ingegneria genetica. Lo scopo della ricerca era dimostrare che se gli animali si fossero ammalati dopo l'inoculazione con prioni, ciò avrebbe indicato che queste molecole possono replicarsi anche in assenza di una fonte di molecole di PrP. Tuttavia, l'inoculazione non ha provocato lo *scrapie* e non è stata individuata traccia di duplicazione dei prioni (68). Dunque il processo patologico avviene solo con la contemporanea presenza di PrP^C e PrP^{Sc}.

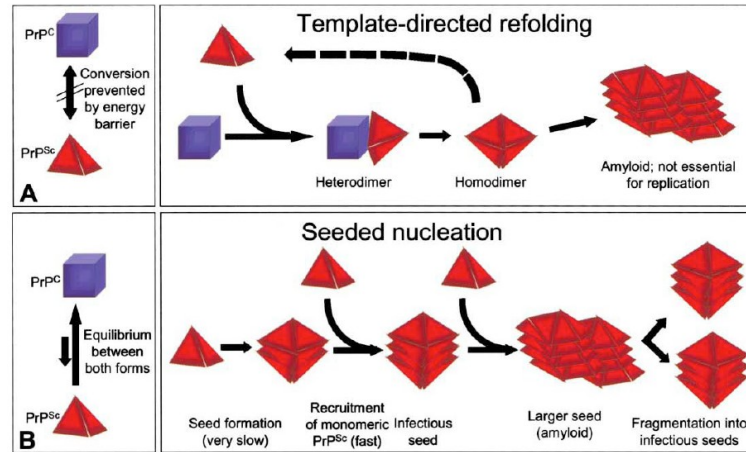


Figura 9. Teoria Prionica. **a:** modello "refolding" o "template-assistance"; **b:** modello "seeding" o "nucleation-polymerization".

Si ritiene, però, che una singola molecola di PrP^{Sc} non sia ancora contagiosa; l'unità infettiva, ossia la quantità minima che può scatenare l'infezione, comprende almeno 100.000 molecole di PrP^{Sc} . Lo si è accertato per mezzo di esperimenti nei quali si sono inoculate quantità diverse di PrP^{Sc} in gruppi di animali sperimentali, osservando poi quanti animali di ogni gruppo si ammalavano e dopo quanto tempo. Si è giunti successivamente a comprendere che presumibilmente occorre tempo, perché una molecola effettui spontaneamente il passaggio, (processo nel quale interverrebbero dei mediatori cellulari, proteina x o chaperoni), ed

ancora più tempo perché la PrP dello *scrapie* si accumuli e danneggi i tessuti cerebrali fino al punto da produrre i sintomi.

Tutti gli eventi descritti, si verificano, a quanto pare, su una membrana nell'interno della cellula. Tuttavia, la trasformazione, in senso patologico, della proteina prionica, potrebbe anche verificarsi a seguito di una mutazione puntiforme del gene codificante, con conseguente sintesi di una proteina modificata, (si ritiene, infatti, che le mutazioni del gene PRPN rendano le proteine risultanti suscettibili al passaggio da una conformazione ad α -elica ad una a foglietto β). È stato, infatti, osservato che molte delle mutazioni nei geni per la PrP, scoperte nell'uomo, provocano la sostituzione di uno degli amminoacidi situati nelle tre ipotetiche eliche o sui loro confini; l'inserimento di amminoacidi scorretti in queste posizioni, potrebbe destabilizzare l'elica, aumentando così la probabilità che la regione interessata, e le sue vicine, si riavvolgano in una conformazione a foglietto β . Le molecole di PrP prodotte da geni mutanti, non adottano però la conformazione che causa lo *scrapie* nel momento della sintesi, altrimenti i portatori di geni mutanti si ammalerebbero nella prima infanzia (56-59).

Anche se la *teoria prionica* è al momento l'ipotesi più accreditata circa le modalità di infezione del prione, rimane tuttavia ancora da chiarire se detta proteina rappresenti l'unico agente responsabile delle TSE o sia il risultato di una trasformazione indotta da un agente virale ("teoria virale"), o da un acido nucleico a bassissimo peso molecolare, legato a una molecola di PrP ("teoria del virino").

La "*teoria virale*" ipotizza la presenza di un virus di dimensioni estremamente ridotte, con un proprio acido nucleico ed almeno una proteina virale. Il virus si legherebbe alla PrP^C ed, in seguito a questa interazione, la proteina verrebbe modificata in PrP^{Sc}. Le particelle virali prodotte all'interno della cellula si legherebbero tenacemente, tramite interazioni idrofobiche, alla PrP^{Sc}, proteggendo il virus dalle procedure di inattivazione (60).

La "*teoria del virino*" o nemavirus, si colloca fra le due teorie precedenti. Il virino sarebbe costituito dall'assemblaggio di una molecola di PrP^{Sc} e da un acido nucleico esogeno non codificante: la porzione esterna, costituita da PrP^{Sc}, si legherebbe alla PrP^C (che anche in questo caso svolgerebbe funzioni di recettore) permettendo la penetrazione del virino all'interno della cellula; a questo punto, l'acido nucleico andrebbe

incontro a svariati cicli di replicazione e andrebbe poi a complessare una molecola di PrP^C endogena, determinandone la conversione conformazionale (60).

2. IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

Sebbene il preciso meccanismo molecolare coinvolto nella conversione di un'isoforma nell'altra non sia ancora ben definito, ammettendo la validità del modello di polimerizzazione nucleata, si può ipotizzare che alcuni ligandi affini alla PrP^C, interagendo selettivamente con specifici siti di legame, possano stabilizzare la proteina, spostando l'equilibrio verso la sua forma cellulare.

Pertanto, l'obiettivo del mio lavoro di Dottorato di Ricerca è stato la progettazione, la sintesi e la valutazione dell'attività farmacologica di nuove molecole in grado di interagire selettivamente con la proteina prionica, bloccandone in maniera specifica la trasformazione nella sua forma patologica e la formazione di fibrille e placche amiloidotiche.

Tale approccio terapeutico rappresenta senz'altro il più promettente, in quanto interessa l'evento centrale nella patogenesi della malattia, ed è l'unico che potrebbe rivelarsi efficace, sia durante il lungo periodo di incubazione, che dopo la manifestazione dei sintomi clinici della malattia.

Com'è noto, in letteratura esiste un considerevole numero di molecole in grado di interferire con l'amplificazione di PrP^{Sc}, ma purtroppo questi composti sono stati identificati per lo più attraverso

osservazioni empiriche e *serendipity* (61), a causa del fatto che a tutt'oggi non è stata ancora accertata sperimentalmente l'esistenza di una specifica regione di legame della proteina, e pertanto risulta molto difficile poter identificare dei *lead compounds* con uno specifico farmacoforo e ottimizzarne la struttura al fine di aumentare la potenza terapeutica e le proprietà farmacologiche.

La progettazione delle molecole sintetizzate durante il mio Dottorato di Ricerca, è stata realizzata tenendo conto della struttura di una piccola molecola organica, recentemente pubblicata in letteratura, indicata con la sigla GN8 (2-pirrolidin-1-il-N-[4-[4-(2-pirrolidin-1-il-acetilamino)-benzil]-fenil]-acetamide Fig. 10), che si è dimostrata in grado di ridurre notevolmente i livelli di proteina patogena in una coltura di cellule di topo infettate da PrP^{Sc}, e di aumentare il tempo di sopravvivenza degli animali infetti, dopo somministrazione in vivo (62).

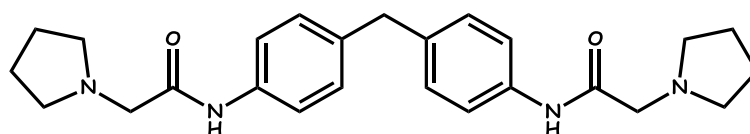


Figura 10. Struttura di GN8: 2-pirrolidin-1-il-N-[4-[4-(2-pirrolidin-1-il-acetilamino)-benzil]-fenil]-acetamide

Tale molecola è stata identificata attraverso uno *screening in silico* di una grossa libreria di composti, che ha permesso di individuare una serie di nuovi *leads* capaci di interagire con una specifica tasca amminoacidica della proteina prionica, caratterizzata mediante studi NMR, che si genera durante la conversione di PrP^C a PrP^{Sc}.

Osservando il profilo di stabilità termodinamica della proteina è stata riscontrata l'esistenza di conformazioni intermedie della PrP che si generano a causa di grossi riarrangiamenti strutturali che avvengono a carico di diversi residui amminoacidici delle eliche B e C, le quali sono meno stabili termodinamicamente. Questi residui vanno a costituire una sorta di cavità nella proteina, che appare molto evidente durante la conversione della stessa dalla forma stabile a quella a maggiore energia. Pertanto, una piccola molecola capace di legarsi specificamente a questi residui potrebbe stabilizzare la PrP nella sua conformazione nativa, provocando una diminuzione dell'energia libera di Gibbs, e potrebbe anche sopprimere il riarrangiamento strutturale che si ha quando la PrP si converte, in quanto regioni molto distanti della sequenza proteica verrebbero a trovarsi stericamente molto vicine.

I residui della proteina prionica sottoposti a queste fluttuazioni globali, localizzati in specifiche posizioni dei *loop* S1 e S2, e delle eliche A B e C, sono mostrati in rosso nella figura 11, mentre la tasca di legame definita da tali residui è mostrata in verde. Secondo questo studio, le zone calde della proteina si troverebbero nel dominio C-terminale e sarebbero rappresentate dal residuo di Asn 159, localizzato tra l'elica A e il *loop* S2 (A-S2 *loop*) e diversi residui amminoacidici (Val 189, Thr 192, e Lys 194), tra cui un ruolo chiave sarebbe svolto dal Glu 196, localizzati nella regione che collega l'elica B al *loop* tra B e C.

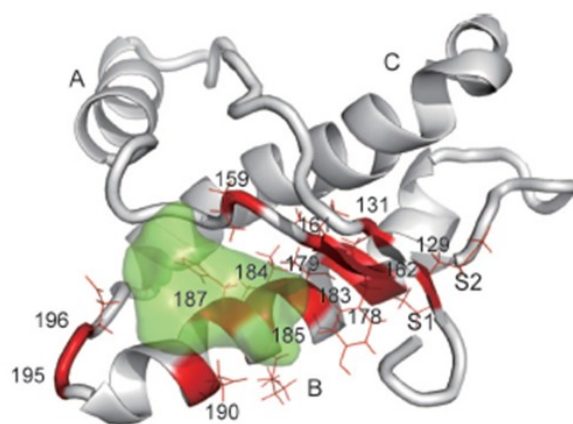


Figura 11. Residui della PrP^C mdi topo sottoposti a fluttuazioni globali. Residui 124–226 (rosso) e tasca di legame (verde) definita da tali residui. S1, A, S2, B, e C indicano il loop S1, l'elica A, il loop S2, l'elica B, e l'elica C, rispettivamente.

Nella figura 12 è mostrato l'ipotetico complesso che GN8 formerebbe con la PrP di ratto. Mediante studi di *dynamic-based drug discovery*, si è osservato che GN8 si lega molto specificamente ai suddetti residui instabili, inserendosi perfettamente nella tasca di legame. Approcci computazionali e studi di *docking* hanno permesso di identificare i siti di legame presenti sulla superficie della PrP.

La molecola GN8 è simmetrica e strutturalmente molto semplice, composta da due fenili uniti mediante un ponte metilenico, e da due anelli pirrolidinici connessi mediante gruppi acetamidici ai fenili.

Osservandola all'interno del sito di legame della PrP, si nota che la sua struttura le permette di fare da ponte di connessione tra due distanti regioni della proteina, in particolare la regione A-S2 *loop*, mediante formazione di un legame a idrogeno tra l'ossigeno del carbonile dell'Asn 159, mostrato in blu nella figura 12b, e l'azoto di GN8 (N3), e la regione B-C *loop* mediante un legame a idrogeno tra l'azoto del Glu 196 dell'elica B (mostrato in rosso) e l'ossigeno del carbonile della molecola (O5). L'avvicinamento di queste due regioni della proteina potrebbe essere essenziale per stabilizzarla nella conformazione nativa, in quanto è stato osservato che questi due residui, Asn 159 e Glu 196, che appaiono

molto vicini (15.4 Å) nella PrP^C, risultano invece molto distanti (45.2 Å) nella isoforma instabile ad alta energia. Poiché GN8 unisce queste due regioni della PrP^C mediante ponti a idrogeno, grossi cambi conformazionali sarebbero proibiti e pertanto potrebbe essere impedita la formazione della PrP^{Sc}. Nel modello proposto, i due anelli aromatici di GN8 stabiliscono per lo più interazioni π con i gruppi metilenici della Lys 194 e dell'Arg 156, mentre i due anelli pirrolidinici stabiliscono interazioni idrofobiche con le unità metileniche del Glu 196 e dell'Asn 159.

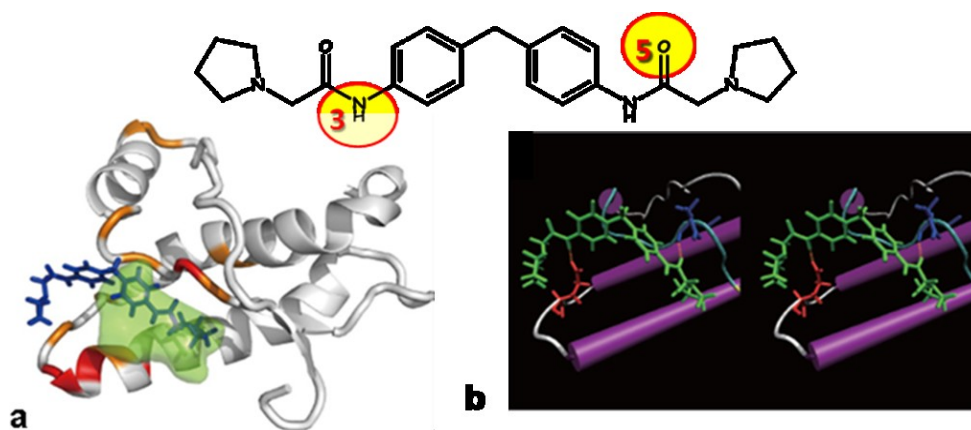


Figura 12. Complesso GN8 e PrP di topo. **a:** GN8 è mostrato in blu nella tasca si legame verde. **b:** GN8 è mostrato in verde, E196 in rosso, N159 in blu e le linee arancio rappresentano i presunti legami a idrogeno.

Sulla base di quanto illustrato, e partendo dall'analisi del complesso GN8/PrP^C, durante il mio lavoro di Dottorato, sono state progettate e sintetizzate piccole molecole organiche caratterizzate dai requisiti strutturali necessari all'interazione con la proteina prionica, e, effettuando una serie di farmacomodulazioni basate sui principi di isosteria e bioisosteria sono stati ottenuti i composti **1-34** riportati nelle tabelle 1 e 2 (69).

Confrontando la struttura generale dei composti **1-34**, con quella di GN8, si nota che, innanzitutto il ponte metilenico tra i due anelli aromatici è stato sostituito da un ponte di ossigeno, al fine di stabilire nuovi legami a idrogeno che potessero intrappolare meglio la molecola nel sito di legame; inoltre, in tutte le molecole sintetizzate, da un lato è stata lasciata inalterata una delle due porzioni acetamidiche, sostituendo, in una serie di derivati, solo la pirrolidina con la piperidina, mentre, dall'altro lato, è stata eliminata la porzione metilénpirrolidinica, inserendo sostituenti aromatici o alifatici, elettronattrattori o elettron-donatori, sia lineari che stericamente ingombrati. Tali sostituenti, dotati di diverse proprietà steriche, elettroniche e lipofile, sono stati scelti al fine di fornire informazioni circa le relazioni struttura attività, e

chiarire i requisiti strutturali necessari per un'ottimale affinità di legame e una maggiore selettività. Infine, in tutti i derivati della serie è stata introdotta una catena alchilica, di lunghezza variabile, legata mediante una funzione ammidica all'anello aromatico. Per questa scelta ci siamo rifatti alla struttura di alcune fenotiazine (promazina, clorpromazina, ecc..) e soprattutto di un loro antecedente strutturale, la chinacrina, che già da molti anni sono utilizzate nel trattamento della malattia di CJD. Sebbene non si conosca con certezza il loro preciso meccanismo d'azione, è noto ormai che tali molecole sono dotate di una notevole efficacia, testata sia in vitro che in vivo, contro la proteina prionica. Osservando la struttura di questi composti (Fig. 13), appare evidente che l'elemento che li accomuna è la loro catena laterale alifatica. Da un'analisi dei dati sperimentali relativi ad uno studio condotto su molte fenotiazine, è stato dedotto che i composti che presentano solo il sistema tricyclico non sono in grado di inibire la formazione di PrP^{Sc}, in quanto per acquisire tale capacità è necessaria la catena laterale nell'anello centrale (63).

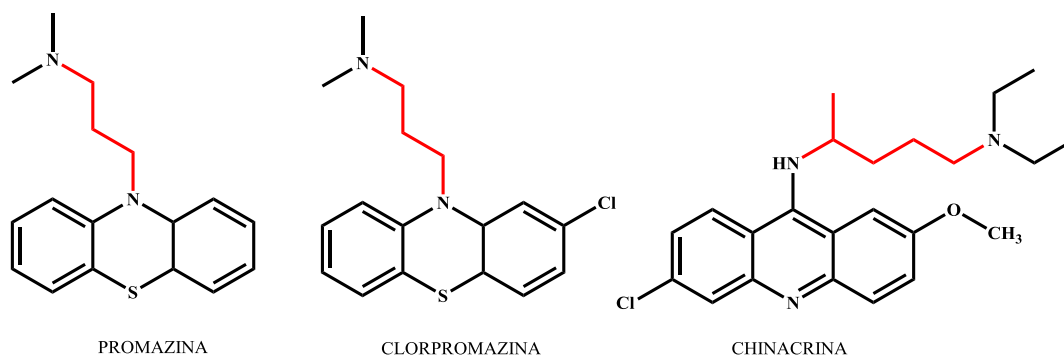


Figura 13. Strutture di antipsicotici utilizzati nel trattamento delle TSE.

Tabella 1. Composti 1-18

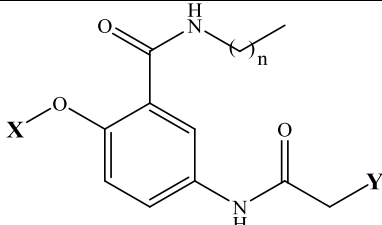
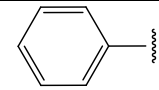
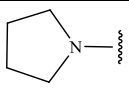
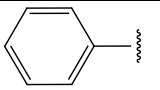
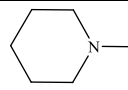
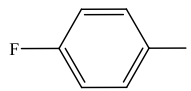
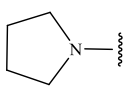
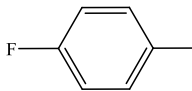
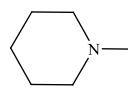
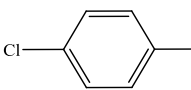
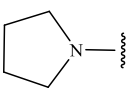
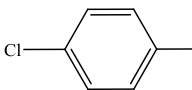
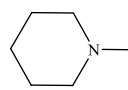
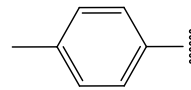
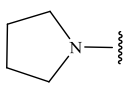
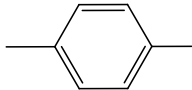
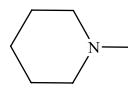
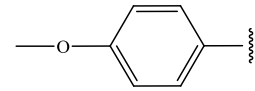
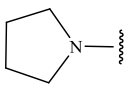
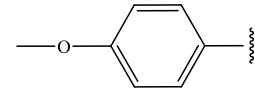
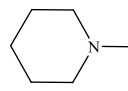
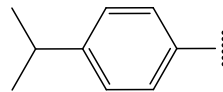
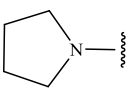
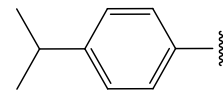
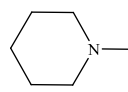
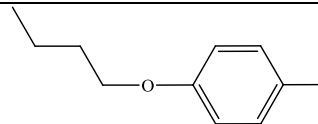
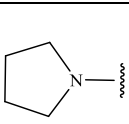
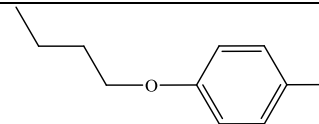
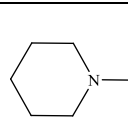
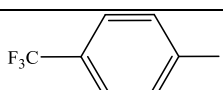
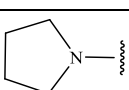
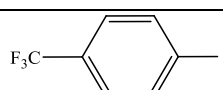
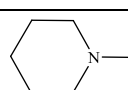
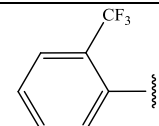
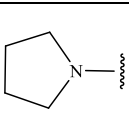
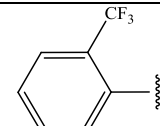
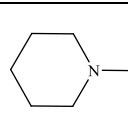
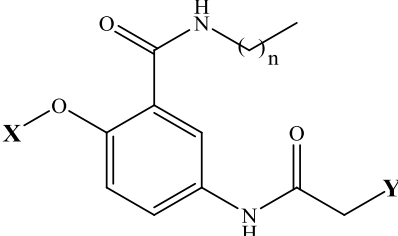
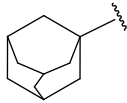
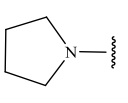
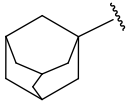
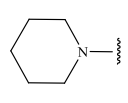
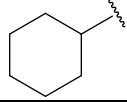
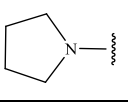
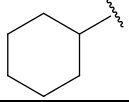
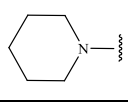

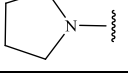

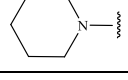

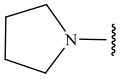

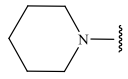
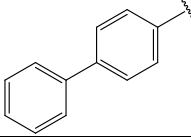
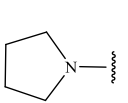
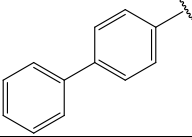
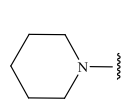
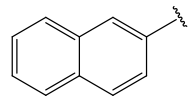
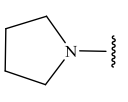
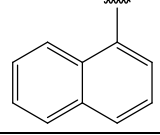
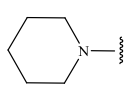
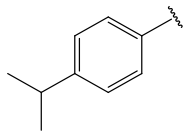
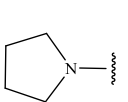
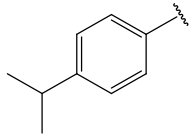
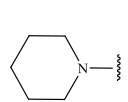
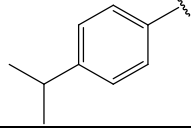
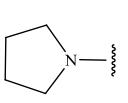
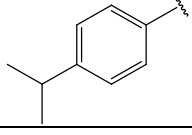
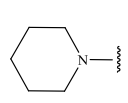
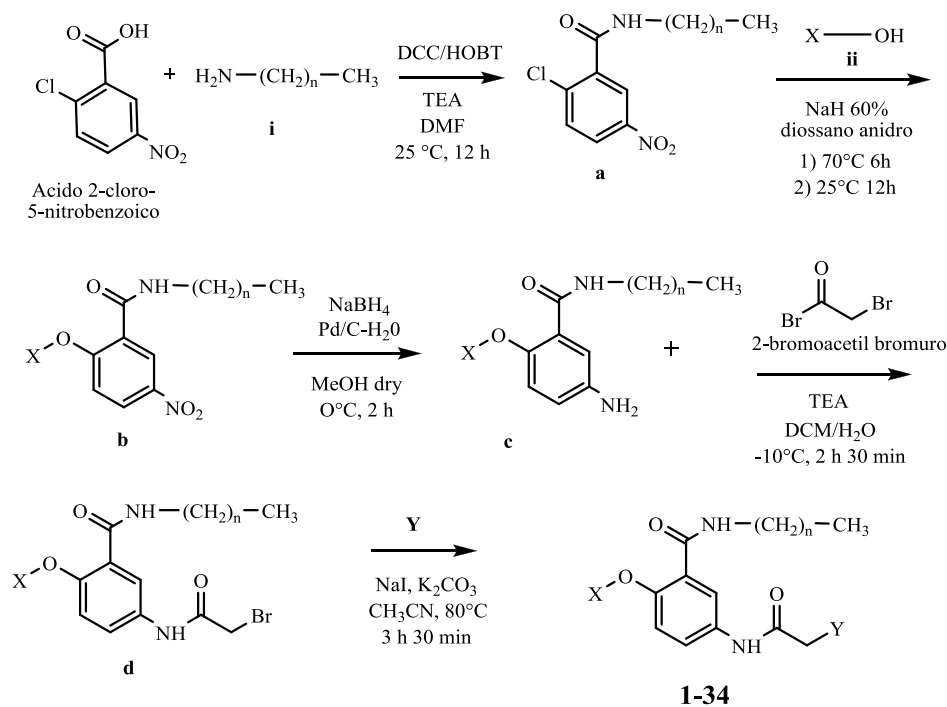
							
N°	X	Y	n	N°	X	Y	n
1			3	10			3
2			3	11			3
3			3	12			3
4			3	13			3
5			3	14			3
6			3	15			3
7			3	16			3
8			3	17			3
9			3	18			3

Tabella 2. Composti 19-34							
							
N°	X	Y	n	N°	X	Y	n
19			3	27			3
20			3	28			3
21			3	29			3
22			3	30			3
23			3	31			3
24			3	32			3
25			1	33			1
26			5	34			5

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1. Procedura generale della sintesi



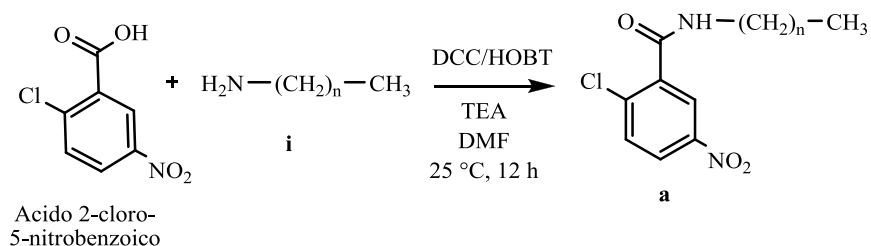
Schema 1. Sintesi dei composti **1-34**. **i**: 1-butilammina, 1-esilammina, etilammina. **ii**: alcol o fenolo corrispondente. **Y**: pirrolidina, piperidina.

Nel primo stadio della sintesi, l'acido 2-cloro-5-nitrobenzoico, sciolto in DMF, viene fatto reagire con l'opportuna ammina primaria cloridrata (**i**), via DCC/HOBT, in presenza di TEA, a temperatura ambiente, per circa 12 ore, per ottenere l'intermedio **a**. Il composto ottenuto reagisce poi con l'opportuno alcol o fenolo (**ii**), sciolto in

diossano anidro, in presenza di NaH al 60%, a 70 °C per 6 ore, e a temperatura ambiente per circa 12 ore, per fornire l'intermedio **b**. Quest'ultimo viene disciolto in metanolo anidro e sottoposto a riduzione del gruppo nitro mediante NaBH₄ e C/Pd al 10%, in corrente d'azoto, a 0 C°, per due ore. Il derivato amminico **c** viene solubilizzato in una miscela di DCM/H₂O 9:1, e condensato con il 2-bromo acetil bromuro alla temperatura di – 10 C°, in presenza di TEA, per un tempo di 2 ore e 30 minuti. Nell'ultimo stadio della sintesi, l'intermedio **d** ottenuto, sciolto in CH₃CN, viene fatto reagire con l'opportuna ammina ciclica **Y** (pirrolidina per i derivati **1-9** e **19-26** e piperidina per i derivati **10-18** e **27-34**) in presenza di NaI e K₂CO₃, alla temperatura di 80 °C, per 3 ore e 30 minuti, per fornire i composti finali **1-34**. I prodotti finali sono stati tutti purificati mediante cromatografia su colonna di gel di silice e caratterizzati mediante ¹H-NMR e ESI-MS. I dati ottenuti sono consistenti con le strutture proposte.

3.2 Procedimenti sperimentali della sintesi

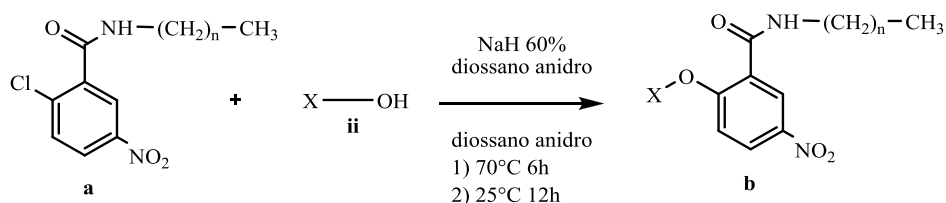
3.2.1 Sintesi dell'intermedio a



L'acido 2-cloro-5-nitrobenzoico (10 g, 0,050 mol), commercialmente disponibile, viene disciolto in DMF anidro (100 mL), e successivamente fatto reagire con HOBT (7,34 g, 0,054 mol) e DCC (11,14 g, 0,054 mol), sotto agitazione elettromagnetica per circa 30 minuti, alla temperatura di 0 °C. Successivamente, si aggiunge l'opportuna ammina primaria alifatica cloridrata **i** (1-butilammina per i composti **1-24** e **27-32**, 1-esilammina per i composti **26** e **34**, e etilammina per i composti **25** e **33**, 0,050 mol), e TEA (5,06 g, 0,050 mol). La sospensione pastosa si trasforma così in una soluzione limpida color arancio, che viene agitata a 0 °C per due ore e a temperatura ambiente per tutta la notte. Trascorso questo tempo, si filtra sotto vuoto per allontanare la N,N'-dicicloesilurea (DCU) formatasi, e il filtrato

viene concentrato sotto vuoto per allontanare la DMF. Il residuo ottenuto viene sciolto in DCM, e lavato consecutivamente con NaOH 1 N, HCl 1 N e H₂O satura di NaCl. La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro e successivamente filtrata. Il filtrato viene infine concentrato sotto vuoto e il residuo, così ottenuto, viene purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando come miscela eluente dietilere- etere di petrolio 7:3 (v/v). L'intermedio **a** viene ottenuto sottoforma di soldo giallo dopo cristallizzazione da dietilere-etanolo, con rese dal 77 all'88%.

3.2.2 Sintesi dell'intermedio b

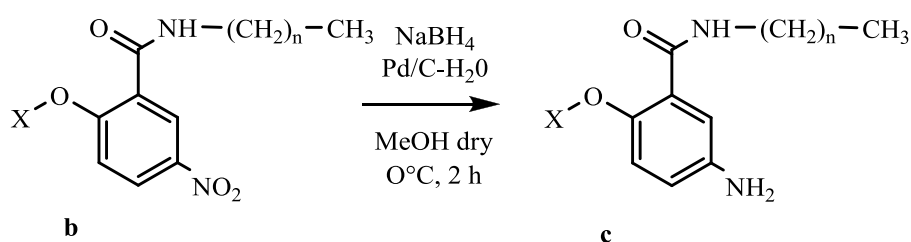


Ad una soluzione di NaH (60% in olio minerale, 3,35 g, 84,0 mmol) in diossano anidro (150 mL), viene aggiunto l'opportuno alcol o fenolo **ii** (fenolo per i composti **1** e **10**, *p*-fluorofenolo per i composti **2** e **11**, *p*-

clorofenolo per i composti **3** e **12**, *p*-cresolo per i composti **4** e **13**, *p*-metossifenolo per i composti **5** e **14**, *p*-isopropilfenolo per i composti **6**, **15**, **25**, **26**, **33** e **34**, *p*-butossifenolo per i composti **7** e **16**, *p*-(trifluorometil)fenolo per i composti **8** e **17**, *o*-(trifluorometil)fenolo per i composti **9** e **18**, adamantan-1-olo per i composti **19** e **27**, cicloesano per i composti **20** e **28**, alcool propargilico per i composti **21** e **29**, alcool isopropilico per i composti **22** e **30**, bifenil-4-olo per i composti **23** e **31**, β -naftolo per il composto **24** e α -naftolo per il composto **32**, 79,0 mmol) in un bagno di ghiaccio ed in atmosfera di azoto. Una volta terminata la produzione di idrogeno, la miscela di reazione viene agitata a 70°C per due ore. Successivamente l'intermedio **a** (76,4 mmol), solubilizzato in diossano anidro (100 mL), viene aggiunto goccia a goccia, tramite imbuto gocciolatore, e la miscela viene agitata a 70°C per quattro ore, e a temperatura ambiente per tutta la notte. Trascorso questo tempo, il solvente viene allontanato sotto vuoto, e il residuo viene disciolto in etile acetato e lavato con acqua satura di cloruro di sodio. La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata e concentrata sotto vuoto. Il residuo viene purificato su colonna, utilizzando gel di silice come fase stazionaria e dietilere/esano 6:4 (v/v) come eluente. Le frazioni

ottenute, riunite ed evaporate, vengono cristallizzate da dietiletere fornendo l'intermedio **b** con rese dal 41 all'88%.

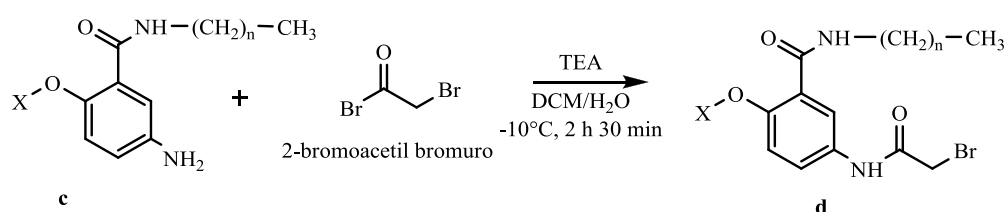
3.2.3 Sintesi dell'intermedio **c**



Ad una sospensione di Pd/C (0,15 g) in 15 mL di acqua, viene aggiunta una sospensione (20 mL) di NaBH₄ (1,0 g, 26,4 mmol) in acqua. La miscela risultante viene agitata a temperatura ambiente in atmosfera di azoto per 10 minuti. Successivamente viene aggiunto l'intermedio **c** (8,1 mmol) in 100 mL di metanolo, goccia a goccia, tramite imbuto gocciolatore e la soluzione viene agitata per 30 minuti. Trascorso questo tempo la miscela di reazione viene filtrata attraverso un letto di Celite, e il filtrato viene acidificato con HCl 1N per rimuovere l'eccesso di NaBH₄. La soluzione acida viene poi alcalinizzata tramite aggiunta di NaOH 2N e la sospensione risultante viene estratta con

dietiletere. La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto, per fornire l'intermedio **c** sottoforma di solido bianco con rese dal 35 all'87%.

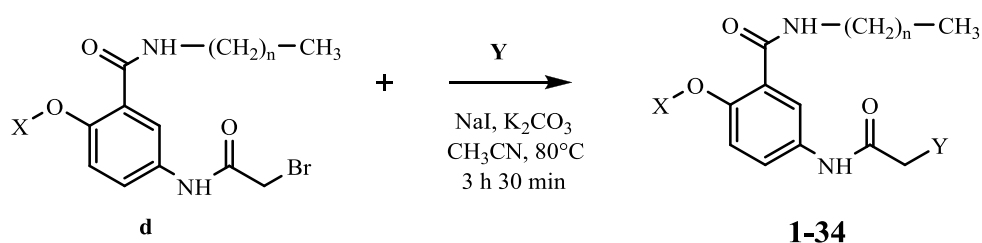
3.2.4 Sintesi dell'intermedio **d**



L'intermedio **c** (4,16 mmol) viene solubilizzato in una miscela di DCM e H₂O 9:1 (100 mL) e successivamente viene aggiunta TEA (5 mmol). La miscela di reazione si lascia a -10 C° sotto agitazione elettromagnetica per 10 min. Trascorso questo tempo, si aggiunge goccia a goccia, tramite imbuto gocciolatore, una miscela di 2-bromo acetyl bromuro (1,68 g, 8,34 mmol) in DCM (100 mL) e si lascia andare la reazione per circa 2 ore e 30 min. Si procede poi con un'estrazione mediante imbuto separatore, usando come fase organica DCM e come fasi acquose H₂O distillata e H₂O satura di NaCl. Si anidrifica la fase

organica con Na₂SO₄, si filtra e si concentra sotto vuoto. Il residuo viene cristallizzato da esano. L'intermedio **d** si ottiene, sottoforma di solido bianco, con rese comprese tra il 35 e il 98%.

3.2.5 Sintesi dei composti finali 1-34



L'intermedio **d** (3,14 mmol) e NaI (0,71 g, 4,72 mmol) vengono solubilizzati in circa 15 mL di CH₃CN, e la miscela di reazione viene agitata per 30 minuti alla temperatura di 80°C. Successivamente si aggiungono l'opportuna ammina ciclica Y (pirrolidina 0,22 g, 3,14 mmol per i derivati **1-9** e **19-26** e piperidina 0,27 g, 3,14 mmol, per i derivati **10-18** e **27-34**) e il K₂CO₃ (0,65 g, 4,72 mmol) sciolti in 15 mL di CH₃CN e la miscela viene agitata per circa 3 ore e 30 minuti. Trascorso questo tempo si filtra sotto vuoto il K₂CO₃, e il filtrato viene portato a secco. Il residuo ottenuto viene purificato mediante cromatografia su

colonna di gel di silice, usando come eluente una miscela di dietiletere e metanolo 9,5:0,5 (v/v). Le frazioni ottenute, riunite ed evaporate, vengono cristallizzate da dietiletere, e il prodotto finale viene isolato con rese variabili dal 34 al 97%.

3.3 Caratterizzazione dei composti 1-34

Sia i prodotti finali che gli intermedi di reazione sono stati caratterizzati mediante analisi ESI-MS, utilizzando uno spettrometro di massa API 2000 Applied Biosystem, ESI-triplo quadrupolo, e spettroscopia ^1H -NMR. Gli spettri NMR sono stati registrati su un apparecchio Varian Mercury Plus 400 MHz e utilizzando come solvente CDCl_3 . I chemical shift (δ) sono espressi in ppm usando MeSi_4 come standard interno, e le costanti di accoppiamento J sono espresse in Hertz. Le seguenti abbreviazioni sono usate per descrivere i patterns dei picchi: s (singoletto), d (doppio), dd (doppio doppio), t (tripletto), q (quadrupletto), qt (quintupletto), m (multipletto), bs (broad singolet). Le analisi elementari sono state condotte mediante apparecchio Perkin-Elmer 2400 e i valori sono compresi nell'intervallo $\pm 0.4\%$ dei valori

teorici. Per i prodotti finali, inoltre, è stato determinato il punto di fusione mediante apparecchio elettrico Büchi 540.

N-butil-2-cloro-5-nitrobenzamide (1a): resa 77%. ESI-MS: 257.4 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{11}H_{13}ClN_2O_3$): C, 51.87; H, 5.40; Cl, 14.01; N, 11.01. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.46 (d, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 8.19 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.59 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 6.23 (bs, 1H, CONH); 3.48 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH_2NH); 1.89 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH_2CH_2NH); 1.44 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH_2CH_3); 0.98 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH_2CH_3). Spettri simili di 1H -NMR si sono ottenuti per gli intermedi **2a** e **3a**, i dati sono consistenti con le strutture proposte.

N-esil-2-cloro-5-nitrobenzamide (2a): resa 88%. ESI-MS: 285.4 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{13}H_{17}ClN_2O_3$): C, 54.74; H, 5.82; Cl, 12.15; N, 9.44.

N-etil-2-cloro-5-nitrobenzamide (3a): resa 85%. ESI-MS: 229.5 $[M+H]^+$. Anal. ($C_9H_9ClN_2O_3$): C, 47.68; H, 4.27; Cl, 15.61; N, 12.35.

N-butil-5-nitro-2-fenossibenzamide (1b): resa 82%. ESI-MS: 315.7 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{17}H_{18}N_2O_4$): C, 65.16; H, 6.07; N, 10.21. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.09 (s, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 8.40 (d, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.88 (bs, 1H, CONH); 7.41 (d, 1H, ArH); 7.22 (t, 2H, ArH); 6.98

(t, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 6.92 (d, 2H, ArH); 3.49 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 1.59 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.48 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.98 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃). Spettri simili di ¹H-NMR si sono ottenuti per gli intermedi **2b-18b**, i dati sono consistenti con le strutture proposte.

N-esil-2-(4-isopropilfenossi)-5-nitrobenzamide (2b): resa 79%. ESI-MS: 385,7 [M+H]⁺. Anal. (C₂₂H₂₈N₂O₄): C, 68.83; H, 7.74; N, 6.99.

N-etil-2-(4-isopropilfenossi)-5-nitrobenzamide (3b): resa 87%. ESI-MS: 328,4 [M+H]⁺. Anal. (C₁₈H₂₀N₂O₄): C, 65.84; H, 6.24; N, 8.43.

N-butil-2-(4-isopropilfenossi)-5-nitrobenzamide (4b): resa 80%. ESI-MS: 357,8 [M+H]⁺. Anal. (C₂₀H₂₄N₂O₄): C, 67.60; H, 6.59; N, 7.46.

N-butil-2-(4-fluorofenossi)-5-nitrobenzamide (5b): resa 72%. ESI-MS: 333,8 [M+H]⁺. Anal. (C₁₇H₁₇FN₂O₄): C, 61.54; H, 5.46; F, 5.73; N, 8.32.

N-butil-2-(4-clorofenossi)-5-nitrobenzamide (6b): resa 82%. ESI-MS: 349,3 [M+H]⁺. Anal. (C₁₇H₁₇ClN₂O₄): C, 58.68; H, 4.52; Cl, 10.34; N, 8.39.

N-butil-2-(4-tolilossi)-5-nitrobenzamide (7b): resa 79%. ESI-MS: 329,4 [M+H]⁺. Anal. (C₁₈H₂₀N₂O₄): C, 66.09; H, 6.28; N, 8.73.

N-butil-2-(4-metossifenossi)-5-nitrobenzamide (8b): resa 68%. ESI-MS: 345,5 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{18}H_{20}N_2O_5$): C, 62.88; H, 6.15; N, 8.37.

N-butil-2-(4-butossifenossi)-5-nitrobenzamide (9b): resa 82%. ESI-MS: 387,8 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{21}H_{26}N_2O_5$): C, 65.37; H, 7.09; N, 7.37.

N-butil-2-(4-(trifluorometil)fenossi)-5-nitrobenzamide (10b): resa 41%. ESI-MS: 383,2 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{18}H_{17}F_3N_2O_4$): C, 56.68; H, 4.62; F, 15.07; N, 7.50.

N-butil-2-(2-(trifluorometil)fenossi)-5-nitrobenzamide (11b): resa 57%. ESI-MS: 383,5 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{18}H_{17}F_3N_2O_4$): C, 56.91; H, 4.15; F, 14.63; N, 7.14.

N-butil-2-(4-adamantan-1-ossi)-5-nitrobenzamide (12b): resa 51%. ESI-MS: 373,1 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{21}H_{28}N_2O_4$): C, 67.52; H, 7.37; N, 7.30.

N-butil-2-(cicloesilossi)-5-nitrobenzamide (13b): resa 75%. ESI-MS: 321,8 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{17}H_{24}N_2O_4$): C, 63.43; H, 7.24; N, 8.42.

N-butil-2-(prop-2-inilossi)-5-nitrobenzamide (14b): resa 53%. ESI-MS: 277,8 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{14}H_{16}N_2O_4$): C, 61.17; H, 5.84; N, 10.29.

N-butil-2-isopropossi-5-nitrobenzamide (15b): resa 68%. ESI-MS: 2817,4 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{14}H_{20}N_2O_4$): C, 60.24; H, 7.01; N, 10.09.

N-butil-2-(bifenil-4-ilossi)-5-nitrobenzamide (16b): resa 75%. ESI-MS: 391,2 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{23}H_{22}N_2O_4$): C, 71.15; H, 5.58; N, 7.17.

N-butil-2-(naftalen-2-ilossi)-5-nitrobenzamide (17b): resa 88%. ESI-MS: 365,3 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{21}H_{20}N_2O_4$): C, 69.53; H, 5.53; N, 7.79.

N-butil-2-(naftalen-1-ilossi)-5-nitrobenzamide (18b): resa 87%. ESI-MS: 365,5 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{21}H_{20}N_2O_4$): C, 69.90; H, 5.80; N, 7.54.

N-butil-5-ammino-2-fenossibenzamide (1c): resa 42%. ESI-MS: 285,56 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{17}H_{20}N_2O_2$): C, 71.83; H, 7.10; N, 9.73. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.35 (bs, 1H, CONH); 7.75 (d, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 4.44 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.30-6.95 (m, 5H, ArH); 3.35 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH_2NH); 1.44 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH_2CH_2NH); 1.28 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH_2CH_3); 0.89 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH_2CH_3). Spettri simili di 1H -NMR si sono ottenuti per gli intermedi **2c-18c**, i dati sono consistenti con le strutture proposte.

N-esil-5-ammino-2-(4-isopropilfenossi)benzamide (2c): resa 71%. ESI-MS: 356,8 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{22}H_{30}N_2O_2$): C, 74.43; H, 8.33; N, 7.93.

N-etil-5-ammino-2-(4-isopropilfenossi)benzamide (3c): resa 66%. ESI-MS: 299,1 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{18}H_{22}N_2O_2$): C, 72.26; H, 7.46; N, 9.45.

N-butil-5-ammino-2-(4-isopropilfenossi)benzamide (4c): resa 43%.

ESI-MS: 327,5 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{20}H_{26}N_2O_2$): C, 73.62; H, 8.13; N, 8.28.

N-butil-5-ammino-2-(4-fluorofenossi)benzamide (5c): resa 71%. ESI-

MS: 303,3 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{17}H_{19}FN_2O_2$): C, 67.35; H, 6.12; F, 6.48; N, 9.22.

N-butil-5-ammino-2-(4-clorofenossi)benzamide (6c): resa 73%. ESI-

MS: 319,4 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{17}H_{19}ClN_2O_2$): C, 64.12; H, 6.01; Cl, 11.21; N, 8.79.

N-butil-5-ammino-2-(4-tolilossi)benzamide (7c): resa 43%. ESI-MS:

299,6 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{18}H_{22}N_2O_2$): C, 72.66; H, 7.53; N, 9.59.

N-butil-5-ammino-2-(4-metossifenossi)benzamide (8c): resa 78%. ESI-

MS: 315,6 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{18}H_{22}N_2O_3$): C, 68.37; H, 7.15; N, 8.71.

N-butil-5-ammino-2-(4-butossifenossi)benzamide (9c): resa 46%. ESI-

MS: 357,6 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{21}H_{28}N_2O_3$): C, 70.66; H, 7.82; N, 7.76.

N-butil-5-ammino-2-(4-(trifluorometil)fenossi)benzamide (10c): resa

40%. ESI-MS: 353,4 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{18}H_{19}F_3N_2O_2$): C, 61.35; H, 5.43; F, 16.19; N, 7.94.

N-butil-5-ammino-2-(2-(trifluorometil)fenossi)benzamide (11c): resa 82%. ESI-MS: 353,6 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{18}H_{19}F_3N_2O_2$): C, 61.25; H, 5.32; F, 16.25; N, 7.81.

N-butil-5-ammino-2-(4-adamantan-1-ossi)benzamide (12c): resa 43%. ESI-MS: 343,6 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{21}H_{30}N_2O_2$): C, 73.64; H, 8.82; N, 8.17.

N-butil-5-ammino-2-(cicloesilossi)benzamide (13c): resa 87%. ESI-MS: 291,3 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{17}H_{26}N_2O_2$): C, 70.42; H, 9.13; N, 9.74.

N-butil-5-ammino-2-(prop-2-inilossi)benzamide (14c): resa 42%. ESI-MS: 247,4 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{14}H_{18}N_2O_2$): C, 68.37; H, 7.27; N, 11.17.

N-butil-5-ammino-2-isopropossibenzamide (15c): resa 53%. ESI-MS: 251,7 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{14}H_{22}N_2O_2$): C, 67.21; H, 8.91; N, 11.23.

N-butil-5-ammino-2-(bifenil-4-ilossi)benzamide (16c): resa 35%. ESI-MS: 361,2 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{23}H_{24}N_2O_2$): C, 76.59; H, 6.69; N, 7.79.

N-butil-5-ammino-2-(naftalen-2-ilossi)benzamide (17c): resa 55%. ESI-MS: 335,1 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{21}H_{22}N_2O_2$): C, 75.41; H, 6.61; N, 8.31.

N-butil-5-ammino-2-(naftalen-1-ilossi)benzamide (18c): resa 47%. ESI-MS: 335,6 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{21}H_{22}N_2O_2$): C, 75.62; H, 6.53; N, 8.38.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-fenossibenzamide (1d): resa 91%. ESI-MS: 406,7 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{19}H_{21}BrN_2O_3$): C, 56.42; H, 5.33; Br,

19.83; N, 6.71. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.35 (bs, 1H, CONH); 8.03 (bs, 1H, NHCO); 7.75 (d, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 4.44 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.30-6.95 (m, 5H, ArH); 4.24 (s, 2H, CH_2Br); 3.35 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH_2NH); 1.44 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 1.28 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH_2CH_3); 0.89 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH_2CH_3). Spettri simili di $^1\text{H-NMR}$ si sono ottenuti per gli intermedi **2d-18d**, i dati sono consistenti con le strutture proposte.

N-esil-5-(2-bromoacetamido)-2-(4-isopropilfenossi)benzamide (2d):
resa 40%. ESI-MS: 476,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. ($\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{BrN}_2\text{O}_3$): C, 60.43; H, 6.54; Br, 16.81; N, 5.78.

N-etil-5-(2-bromoacetamido)-2-(4-isopropilfenossi)benzamide (3d):
resa 89%. ESI-MS: 420,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_3$): C, 57.33; H, 5.64; Br, 19.16; N, 6.58.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(4-isopropilfenossi)benzamide (4d):
resa 90%. ESI-MS: 448,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. ($\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_3$): C, 59.08; H, 6.18; Br, 17.48; N, 6.16.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(4-fluorofenossi)benzamide (5d):
resa 95%. ESI-MS: 424,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. ($\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{BrFN}_2\text{O}_3$): C, 53.93; H, 4.71; Br, 18.82; F, 4.43; N, 6.64.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(4-clorofenossi)benzamide (6d): resa 98%. ESI-MS: 440,2 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{19}H_{20}BrClN_2O_3$): C, 51.91; H, 4.52; Br, 18.13; Cl, 8.04; N, 6.35.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(4-tolilossi)benzamide (7d): resa 97%. ESI-MS: 420,5 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{20}H_{23}BrN_2O_3$): C, 57.25; H, 5.54; Br, 19.03; N, 6.62.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(4-metossifenossi)benzamide (8d): resa 93%. ESI-MS: 436,2 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{20}H_{23}BrN_2O_4$): C, 55.19; H, 5.38; Br, 18.37; N, 6.46.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(4-butossifenossi)benzamide (9d): resa 67%. ESI-MS: 478,5 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{23}H_{29}BrN_2O_4$): C, 57.82; H, 6.13; Br, 16.74; N, 5.85.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(4-trifluorometil)fenossi)benzamide (10d): resa 73%. ESI-MS: 474,4 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{20}H_{20}BrF_3N_2O_3$): C, 50.71; H, 4.22; Br, 16.83; F, 12.04; N, 5.95.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(2-trifluorometil)fenossi)benzamide (11d): resa 35%. ESI-MS: 474,6 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{20}H_{20}BrF_3N_2O_3$): C, 50.77; H, 4.45; Br, 16.65; F, 12.18; N, 5.64.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(4-adamantan-1-ossi)benzamide

(12d): resa 86%. ESI-MS: 464,7 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{23}H_{31}BrN_2O_3$): C, 59.42; H, 6.44; Br, 17.12; N, 6.25.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(cicloesilossi)benzamide (13d): resa 91%. ESI-MS: 412,5 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{19}H_{27}BrN_2O_3$): C, 55.41; H, 6.62; Br, 19.43; N, 6.84.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(prop-2-inilossi)benzamide (14d): resa 90%. ESI-MS: 368,7 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{16}H_{19}BrN_2O_3$): C, 52,31; H, 5.22; Br, 21.73; N, 7.64.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-isopropossibenzamide (15d): resa 87%. ESI-MS: 372,2 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{16}H_{23}BrN_2O_3$): C, 51,79; H, 6.28; Br, 21.57; N, 7.65

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(bifenil-4-ilossi)benzamide (16d): resa 66%. ESI-MS: 482,4 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{25}H_{25}BrN_2O_3$): C, 62.58; H, 5.43; Br, 16.80; N, 5.92.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(naftalen-2-ilossi)benzamide (17d): resa 69%. ESI-MS: 454,5 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{23}H_{23}BrN_2O_3$): C, 60.37; H, 5.39; Br, 17.85; N, 6.45.

N-butil-5-(2-bromoacetamido)-2-(naftalen-1-ilossi)benzamide (18d):

resa 89%. ESI-MS: 454,7 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{23}H_{23}BrN_2O_3$): C, 60.51; H, 5.11; Br, 17.62; N, 6.23.

N-butil-2-fenossi-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamide (1): resa

40%, m.p. 111-112 °C, ESI-MS: 396,1 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{23}H_{29}N_3O_3$): C, 69.75; H, 7.49; N, 10.52. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.30 (bs, 1H, CONH); 8.24 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.88 (s, 1H, $J=2.9$ Hz ArH); 7.69 (bs, 1H, NHCO); 7.38 (t, 2H, ArH); 7.18 (t, 1H, ArH); 7.01 (d, 2H, ArH); 6.88 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.44 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH_2NH); 3.27 (s, 2H, $COCH_2$); 2.69 (bs, 4H, Pyrr); 1.86 (bs, 4H, Pyrr); 1.54 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH_2CH_2NH); 1.34 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH_2CH_3); 0.88 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH_2CH_3).

N-butil-2-(4-fluorofenossi)-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamide

(2): resa 85%, m.p. 66-69 °C, ESI-MS: 414.1 $[M+H]^+$. Anal. ($C_{23}H_{28}FN_3O_3$): C, 66.76; H, 6.79; F, 4.65; N, 10.18. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.28 (bs, 1H, CONH); 8.22(dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.88 (s, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.61 (bs, 1H, NHCO); 7.08 (t, 2H, ArH); 6.99 (m, 3H, ArH); 6.83 (d, 1H, $J=7.9$ Hz ArH); 3.45 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH_2NH); 3.27 (s, 2H, $COCH_2$); 2.69 (bs, 4H, Pyrr); 1.86 (bs, 4H, Pyrr);

1.54 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.34 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃);
0.90 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butil-2-(4-clorofenossi)-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamide

(3): resa 64%, m.p. 118-121 °C, ESI-MS: 430.1 [M+H]⁺. Anal. (C₂₃H₂₈ClN₃O₃): C, 64.15; H, 6.66; Cl, 8.15; N, 9.54. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.31 (bs, 1H, CONH); 8.24 (d, 1H, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.50 (bs, 1H, NHCO); 7.33 (d, 2H, ArH); 6.94 (d, 2H, ArH); 6.87 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.43 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.28 (s, 2H, COCH₂); 2.69 (bs, 4H, Pyrr); 1.87 (bs, 4H, Pyrr); 1.50 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.31 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.89 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butil-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)-2-(4-tolilossi)benzamide (4):

resa 71%, m.p. 82-84 °C, ESI-MS: 410.2 [M+H]⁺. Anal. (C₂₄H₃₁N₃O₃): C, 70.60; H, 7.53; N, 10.46. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.26 (bs, 1H, CONH); 8.21 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.75 (bs, 1H, NHCO); 7.17 (d, 2H, ArH); 7.33 (t, 2H, ArH); 6.91 (d, 2H, ArH); 6.84 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.44 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.26 (s, 2H, COCH₂); 2.68 (bs, 4H, Pyrr); 2.34 (s, 3H, ArCH₃);

1.86 (bs, 4H, Pyrr); 1.54 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.34 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.89 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butil-2-(4-metossifenossi)-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamide (5): resa 97%, m.p. 64-66 °C, ESI-MS: 426.2 [M+H]⁺. Anal. (C₂₄H₃₁N₃O₄): C, 67.84; H, 7.35; N, 9.76. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.26 (bs, 1H, CONH); 8.18 (d, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.83 (bs, 1H, NHCO); 6.98 (d, 2H, ArH); 6.91 (d, 2H, ArH); 6.78 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.81 (s, 3H, OCH₃); 3.46 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.26 (s, 2H, COCH₂); 2.68 (bs, 4H, Pyrr); 1.86 (bs, 4H, Pyrr); 1.55 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.36 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.91 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butil-2-(4-isopropilfenossi)-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamide (6): resa 78%, m.p. 68-69 °C, ESI-MS: 438.2 [M+H]⁺. Anal. (C₂₆H₃₅N₃O₃): C, 71.37; H, 8.05; N, 9.69. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.27 (bs, 1H, CONH); 8.21 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.88 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.76 (bs, 1H, NHCO); 7.22 (d, 2H, $J=6.9$ Hz, ArH); 6.94 (d, 2H, ArH); 6.86 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.44 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.26 (s, 2H, COCH₂); 2.93 (m, 1H, CH-Isopropyl); 2.69 (bs,

4H, Pyrr); 1.86 (bs, 4H, Pyrr); 1.54 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.31 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 1.26 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 1.24 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 0.89 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(4-butossifenossi)-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamide (7):

resa 69%, m.p. 65-67 °C, ESI-MS: 468.2 [M+H]⁺. Anal. (C₂₇H₃₇N₃O₄): C, 69.25; H, 7.88; N, 8.99. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.24 (bs, 1H, CONH); 8.17(dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.83 (bs, 1H, NHCO); 6.96 (d, 2H, ArH); 6.90 (d, 2H, ArH); 6.79 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.96 (t, 2H, OCH₂); 3.46 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.26 (s, 2H, COCH₂); 2.68 (bs, 4H, Pyrr); 1.86 (bs, 4H, Pyrr); 1.80 (qt, 2H, OCH₂CH₂); 1.57 (m, 4H, 2CH₂, OCH₂CH₂CH₂, CH₂CH₂NH); 1.36 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.99 (t, 3H, O(CH₂)₃CH₃); 0.91 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)-2-(4-(trifluorometil)fenossi)benzamide (8):

resa 43%, m.p. 110-112 °C, ESI-MS: 464.0 [M+H]⁺. Anal. (C₂₄H₂₈F₃N₃O₃): C, 62.11; H, 6.02; F, 12.33; N, 9.07. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.33 (bs, 1H, CONH); 8.28 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.61 (d, 2H, ArH); 7.29 (bs, 1H,

NHCO); 7.05 (d, 2H, ArH); 6.95 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.40 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.28 (s, 2H, COCH₂); 2.69 (bs, 4H, Pyrr); 1.87 (bs, 4H, Pyrr); 1.47 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.28 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.85 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)-2-(2-(trifluorometil)fenossi)

benzamide (9): resa 92%, m.p. 119-120 °C, ESI-MS: 464.2 [M+H]⁺.

Anal. (C₂₄H₂₈F₃N₃O₃): C, 62.14; H, 6.02; F, 12.43; N, 9.18. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.33 (bs, 1H, CONH); 8.29 (d, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.71 (d, 1H, ArH); 7.48 (t, 1H, ArH), 7.42 (bs, 1H, NHCO); 7.23 (t, 1H, ArNH); 6.92 (d, 1H, ArH); 6.86 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.38 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.28 (s, 2H, COCH₂); 2.69 (bs, 4H, Pyrr); 1.87 (bs, 4H, Pyrr); 1.47 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.27 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.85 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-fenossi-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)benzamide (10): resa

89%, m.p. 99-101 °C, ESI-MS: 410.5 [M+H]⁺. Anal. (C₂₄H₃₁N₃O₃): C, 70.29; H, 7.53; N, 10.16. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.30 (bs, 1H, CONH); 8.22 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.88 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH);

7.66 (bs, 1H, NHCO); 7.38 (t, 2H, ArH); 7.18 (t, 1H, $J=6.9$ Hz, ArH); 7.00 (d, 2H, ArH); 6.88 (d, 1H, ArH); 3.44 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.06 (s, 2H, COCH₂); 2.53 (bs, 4H, Pip); 1.66 (m, 6H, Pip); 1.51 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.32 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.88 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(4-fluorofenossi)-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)benzamide

(11): resa 90%, m.p. 125-126 °C, ESI-MS: 428.4 [M+H]⁺. Anal. (C₂₄H₃₀FN₃O₃): C, 67.41; H, 7.03; F, 4.45; N, 9.87. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.38 (bs, 1H, CONH); 8.20 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.60 (bs, 1H, NHCO); 7.05 (d, 2H, $J=6.9$ Hz, ArH); 6.98 (d, 2H, ArH); 6.83 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.45 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.05 (s, 2H, COCH₂); 2.52 (bs, 4H, Pip); 1.67 (m, 6H, Pip); 1.53 (m, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.34 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.90 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(4-clorofenossi)-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)benzamide

(12): resa 78%, m.p. 122-123 °C, ESI-MS: 444.3 [M+H]⁺. Anal. (C₂₄H₃₀ClN₃O₃): C, 64.99; H, 6.88; Cl, 7.97; N, 9.46. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.40 (bs, 1H, CONH); 8.22 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH);

7.86 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.47 (bs, 1H, NHCO); 7.32 (d, 2H, $J=6.9$ Hz, ArH); 6.93 (d, 2H, ArH); 6.87 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.43 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.06 (s, 2H, COCH₂); 2.53 (bs, 4H, Pip); 1.66 (m, 6H, Pip); 1.52 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.32 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.89 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)-2-(4-tolilossi)benzamide (13):

resa 88%, m.p. 79-82 °C, ESI-MS: 424.4 [M+H]⁺. Anal. (C₂₅H₃₃N₃O₃): C, 70.81; H, 7.82; N, 9.93. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.37 (bs, 1H, CONH); 8.19 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.75 (bs, 1H, NHCO); 7.15 (d, 2H, $J=6.9$ Hz, ArH); 6.91 (d, 2H, ArH); 6.84 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.45 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.05 (s, 2H, COCH₂); 2.52 (bs, 4H, Pip); 2.34 (s, 3H, ArCH₃); 1.66 (m, 6H, Pip); 1.54 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.36 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.89 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(4-metossifenossi)-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)benzamide

(14): resa 97%, m.p. 48-50 °C, ESI-MS: 440.4 [M+H]⁺. Anal. (C₂₅H₃₃N₃O₄): C, 68.21; H, 7.47; N, 9.46. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.35 (bs, 1H, CONH); 8.15 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$

Hz, ArH); 7.81 (bs, 1H, NHCO); 6.97 (d, 2H, ArH); 6.90 (d, 2H, ArNH); 6.78 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.80 (s, 3H, OCH₃); 3.46 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.04 (s, 2H, COCH₂); 2.52 (bs, 4H, Pip); 1.70-1.63 (m, 6H, Pip); 1.55 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.36 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.90 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(4-isopropilfenossi)-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)benzamide (15): resa 92%, m.p. 75-77 °C, ESI-MS: 452.7 [M+H]⁺. Anal. (C₂₇H₃₇N₃O₃): C, 71.61; H, 8.16; N, 9.50. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.37 (bs, 1H, CONH); 8.20 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.75 (bs, 1H, NHCO); 7.22 (d, 2H, $J=6.9$ Hz, ArH); 6.94 (d, 2H, ArH); 6.86 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.44 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.05 (s, 2H, COCH₂); 2.94 (m, 1H, CH-Isopropyl); 2.53 (bs, 4H, Pip); 1.66 (m, 6H, Pip); 1.52 (m, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.33 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 1.27 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 1.24 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 0.89 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(4-butossifenossi)-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)benzamide (16): resa 86%, m.p. 52-54 °C, ESI-MS: 482.7 [M+H]⁺. Anal. (C₂₈H₃₉N₃O₄): C, 69.53; H, 8.33; N, 8.62. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ : 9.35 (bs, 1H, CONH); 8.14 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.83 (bs, 1H, NHCO); 6.96 (d, 2H, $J=6.9$ Hz, ArH); 6.90 (d, 2H, ArH); 6.79 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 3.96 (t, 2H, OCH₂); 3.46 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.05 (s, 2H, COCH₂); 2.53 (bs, 4H, Pip); 1.80 (m, 2H, OCH₂CH₂); 1.64 (m, 6H, Pip); 1.57 (m, 4H, 2CH₂, OCH₂CH₂CH₂, CH₂CH₂NH); 1.36 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.99 (t, 3H, O(CH₂)₃CH₃); 0.91 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)-2-(4-(trifluorometil)fenossi)

benzamide (17): resa 34%, m.p. 62-64 °C, ESI-MS: 478.2 [M+H]⁺. Anal. (C₂₅H₃₀F₃N₃O₃): C, 62.81; H, 6.32; F, 11.93; N, 8.80. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.45 (bs, 1H, CONH); 8.24 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.61 (d, 2H, $J=6.9$ Hz, ArH); 7.04 (d, 2H, ArH); 6.96 (d, 1H, ArH); 3.40 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.07 (s, 2H, COCH₂); 2.54 (bs, 4H, Pip); 1.67 (m, 6H, Pip); 1.48 (m, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.27 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.86 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)-2-(2-(trifluorometil)fenossi)

benzamide (18): resa 54%, m.p. 86-88 °C, ESI-MS: 478.5 [M+H]⁺. Anal. (C₂₅H₃₀F₃N₃O₃): C, 62.89; H, 6.38; F, 11.97; N, 8.86. ¹H-NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ : 9.44 (bs, 1H, CONH); 8.27 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.87 (s, 1H, $J=7.9$ Hz, ArH); 7.72 (d, 1H, ArH), 7.49 (t, 1H, ArH), 7.41 (bs, 1H, NHCO); 7.24 (t, 1H, ArH); 6.92 (d, 1H, ArH); 6.84 (d, 1H, ArH); 3.41 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.07 (s, 2H, COCH₂); 2.54 (bs, 4H, Pip); 1.68 (m, 6H, Pip); 1.44 (m, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.27 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.86 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butil-2-(4-adamantan-1-ossi)-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamide (19): resa 81%, m.p. 126-128 °C, ESI-MS: 454.2 [M+H]⁺. Anal. (C₂₈H₄₁N₃O₃): C, 71.29; H, 8.47; N, 9.16. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.23 (bs, 1H, CONH); 8.20 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 8.05 (bs, 1H, NHCO); 7.78 (s, 1H, ArH); 7.06 (d, 1H, $J=6.9$ Hz, ArH); 3.47 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.25 (s, 2H, COCH₂); 2.67 (bs, 4H, Pyrr); 1.91 (m, 6H, Adamantan); 1.84 (bs, 4H, Pyrr); 1.66-1.55 (m, 6H, Adamantan); 1.47 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.34 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.97 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butil-2-(cicloesilossi)-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamide (20): resa 85%, m.p. 83-84 °C, ESI-MS: 402.7 [M+H]⁺. Anal. (C₂₃H₃₅N₃O₃): C, 68.60; H, 8.87; N, 10.54. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ : 9.17 (bs, 1H, CONH); 8.25 (m, 2H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.82 (bs, 1H, NHCO); 6.97 (d, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 4.72 (m, 1H, cyclohexyl); 3.48 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.25 (s, 2H, COCH₂); 2.67 (bs, 4H, Pyrr); 2.04 (m, 8H, cyclohexyl); 1.85 (bs, 4H, Pyrr); 1.64 (m, 2H, cyclohexyl); 1.55 (m, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.45 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.98 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(prop-2-ynyl)-5-(2-(pyrrolidin-1-yl)acetamido)benzamide

(21): resa 76%, m.p. 157-162 °C, ESI-MS: 358.3 [M+H]⁺. Anal. (C₂₀H₂₇N₃O₃): C, 67.21; H, 7.62; N, 11.73. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.26 (bs, 1H, CONH); 8.28 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.86 (s, 1H, ArH); 7.83 (bs, 1H, NHCO); 7.02 (d, 1H, ArH); 4.79 (s, 1H, CH-Propargyl); 3.48 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.32 (s, 2H, COCH₂); 2.72 (bs, 4H, Pyrr); 2.59 (s, 2H, CH₂-Propargyl); 1.87 (bs, 4H, Pyrr); 1.62 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.46 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.98 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-isopropoxy-5-(2-(pyrrolidin-1-yl)acetamido)benzamide (22):

resa 87%, m.p. 56-59 °C, ESI-MS: 362.3 [M+H]⁺. Anal. (C₂₀H₃₁N₃O₃): C, 66.46; H, 8.65; N, 11.63. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.18 (bs, 1H,

CONH); 8.26 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 8.17 (bs, 1H, NHCO); 7.83 (s, 1H, ArH); 6.96 (d, 1H, ArH); 4.73 (m, 1H, CH-Isopropyl); 3.48 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.26 (s, 2H, COCH₂); 2.68 (bs, 4H, Pyrr); 1.85 (bs, 4H, Pyrr); 1.62 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.48 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 1.46 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 1.44 (s, 3H, CH₃-Isopropyl) 0.98 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(bifenil-4-ilossi)-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamide

(23): resa 69%, m.p. 86-89 °C, ESI-MS: 472.7 [M+H]⁺. Anal. (C₂₉H₃₃N₃O₃): C, 73.85; H, 7.04; N, 8.92. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.31 (bs, 1H, CONH); 8.25 (dd, 1H, ArH); 7.90 (s, 1H, ArH); 7.67 (bs, 1H, NHCO); 7.59 (m, 4H, ArH); 7.45 (t, 2H, ArH); 7.34 (t, 1H, ArH); 7.08 (d, 2H, ArH); 6.95 (d, 1H, ArH); 3.45 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.28 (s, 2H, COCH₂); 2.70 (bs, 4H, Pyrr); 1.87 (bs, 4H, Pyrr); 1.53 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.33 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.89 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(naftalen-2-ilossi)-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamide

(24): resa 85%, m.p. 60-63 °C, ESI-MS: 446.7 [M+H]⁺. Anal. (C₂₇H₃₁N₃O₃): C, 72.58; H, 7.21; N, 9.43. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.29 (bs, 1H, CONH); 7.82 (dd, 1H, $J=2.9$ Hz, ArH); 7.74 (s, 1H, ArH);

7.57 (bs, 1H, NHCO); 7.48-7.22 (m, 7H, naphthalene); 6.87 (d, 1H, ArH); 3.99 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 2.95 (s, 2H, COCH₂); 2.28 (bs, 4H, Pyrr); 1.66 (m, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₂NH); 1.61 (bs, 4H, Pyrr); 1.40 (m, 2H, $J=7.9$ Hz, CH₂CH₃); 0.92 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-etil-2-(4-isopropilfenossi)-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamida (25): resa 80%, m.p. 71-74 °C, ESI-MS: 410.5 [M+H]⁺. Anal. (C₂₄H₃₁N₃O₃): C, 70.31; H, 7.62; N, 10.28. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.26 (bs, 1H, CONH); 8.19 (dd, 1H, ArH); 7.88 (s, 1H, ArH); 7.74 (bs, 1H, NHCO); 7.23 (d, 2H, ArH); 6.96 (d, 2H, ArH); 6.85 (d, 1H, ArH); 3.26 (s, 2H, COCH₂); 2.95 (m, 1H, CH-Isopropyl); 2.68 (bs, 4H, Pyrr); 1.86 (bs, 4H, Pyrr); 1.26 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 1.24 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 1.17 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₃).

N-esil-2-(4-isopropilfenossi)-5-(2-(pirrolidin-1-il)acetamido)benzamida (26): resa 67%, m.p. 75-78 °C, ESI-MS: 466.5 [M+H]⁺. Anal. (C₂₈H₃₉N₃O₃): C, 72.21; H, 8.44; N, 9.03. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.27 (bs, 1H, CONH); 8.21 (dd, 1H, ArH); 7.88 (s, 1H, ArH); 7.79 (bs, 1H, NHCO); 7.22 (d, 2H, $J=2.9$ Hz, ArH); 6.94 (d, 2H, ArH); 6.86 (d, 1H, ArH); 3.43 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, CH₂NH); 3.26 (s, 2H, CH₂CO); 2.94 (m, 1H, CH-Isopropyl); 2.68 (bs, 4H, Pyrr); 1.86 (bs, 4H, Pyrr); 1.67 (m,

6H, -CH₂CH₂CH₂-); 1.53 (m, 2H; CH₂CH₃); 1.25 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 1.24 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 0.83 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(4-adamantan-1-ossi)-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)benzamide (27):

resa 84%, m.p. 99-100 °C, ESI-MS: 468.6 [M+H]⁺. Anal. (C₂₈H₄₁N₃O₃): C, 71.92; H, 8.84; N, 8.93. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.33 (bs, 1H, CONH); 8.18 (dd, 1H, ArH); 8.03 (bs, 1H, NHCO); 7.70 (s, 1H, ArH); 7.06 (d, 1H, ArH); 3.47 (q, 2H, *J*=6.9 Hz, CH₂NH); 3.04 (s, 2H, COCH₂); 2.51 (bs, 4H, Pip); 2.18 (m, 6H, Adamantan); 1.91 (m, 6H, Pip); 1.64-1.55 (m, 2H, CH₂.Butyl, 6H, Adamantan); 1.45 (m, 2H, *J*=7.9 Hz, CH₂CH₃); 0.97 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(cicloesilossi)-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)benzamide

(28): resa 74%, m.p. 96-98 °C, ESI-MS: 416.4 [M+H]⁺. Anal. (C₂₄H₃₇N₃O₃): C, 69.34; H, 8.97; N, 10.12. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.27 (bs, 1H, CONH); 8.23 (dd, 1H, *J*=2.9 Hz, ArH); 7.82 (s, 1H, ArH); 6.97 (d, 1H, ArH); 4.44 (s, 1H, Cyclohexyl); 3.48 (q, 2H, *J*=6.9 Hz, CH₂NH); 3.04 (s, 2H, COCH₂); 2.51 (bs, 4H, Pip); 2.06 (m, 8H, Cyclohexyl); 1.78 (m, 2H, Cyclohexyl); 1.65 (m, 6H, Pip); 1.44 (m, 4H, *J*=7.9 Hz, -CH₂CH₂-); 0.94 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-5-(2-(piperidin-1-yl)acetamido)-2-(prop-2-yn-1-yl)benzamide

(29): resa 71%, m.p. 96-99 °C, ESI-MS: 372.3 [M+H]⁺. Anal. (C₂₁H₂₉N₃O₃): C, 67.87; H, 7.91; N, 11.45. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.31 (bs, 1H, CONH); 8.28 (dd, 1H, ArH); 7.83 (s, 1H, *J*=7.9 Hz, ArH); 7.02 (d, 1H, ArH); 4.79 (s, 1H, CH-Propargyl); 3.49 (q, 2H, *J*=6.9 Hz, CH₂NH); 3.04 (s, 2H, COCH₂); 2.59 (s, 2H, CH₂-Propargyl); 2.51 (bs, 4H, Pip); 1.63 (m, 6H, Pip; 2H, CH₂CH₂NH); 1.46 (m, 2H, *J*=7.9 Hz, CH₂CH₃); 0.96 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-isopropoxy-5-(2-(piperidin-1-yl)acetamido)benzamide (30):

resa 97%, m.p. 90-92 °C, ESI-MS: 376.4 [M+H]⁺. Anal. (C₂₁H₃₃N₃O₃): C, 67.21; H, 8.79; N, 11.15. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.27 (bs, 1H, CONH); 8.25 (dd, 1H, ArH); 8.17 (bs, 1H, NHCO); 7.82 (s, 1H, *J*=7.9 Hz, ArH); 6.96 (d, 1H, ArH); 4.71 (m, 1H, CH-Isopropyl); 3.48 (q, 2H, *J*=6.9 Hz, CH₂NH); 3.04 (s, 2H, COCH₂); 2.51 (bs, 4H, Pip); 1.68-1.57 (m, 6H, Pip, 2H, CH₂CH₂NH); 1.46 (m, 2H, *J*=6.9 Hz, CH₂CH₃); 1.41 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 1.39 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 0.98 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(biphenyl-4-yl)-5-(2-(piperidin-1-yl)acetamido)benzamide

(31): resa 44%, m.p. 67-69 °C, ESI-MS: 486.5 [M+H]⁺. Anal.

(C₃₀H₃₅N₃O₃): C, 74.22; H, 7.21; N, 8.65. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)
δ: 9.42 (bs, 1H, CONH); 8.22 (dd, 1H, ArH); 7.90 (s, 1H, ArH); 7.66 (bs, 1H, NHCO); 7.58 (m, 4H, ArH); 7.45 (t, 2H, ArH); 7.34 (t, 1H, *J*=2.9 Hz, ArH); 7.07 (d, 2H, ArH); 6.96 (d, 1H, ArH); 3.45 (q, 2H, *J*=6.9 Hz, CH₂NH); 3.07 (s, 2H, CH₂CO); 2.54 (bs, 4H, Pip); 1.66 (m, 6H, Pip); 1.54 (m, 2H, *J*=6.9 Hz, CH₂CH₂NH); 1.33 (m, 2H, *J*=7.9 Hz, CH₂CH₃); 0.89 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH₂CH₃).

N-butyl-2-(naftalen-1-ilossi)-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)benzamide (32): resa 53%, m.p. 138-140 °C, ESI-MS: 460.0 [M+H]⁺. Anal. (C₂₈H₃₃N₃O₃): C, 73.08; H, 7.34; N, 9.04. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)
δ: 8.42 (bs, 1H, CONH); 7.90 (dd, 1H, *J*=2.9 Hz, ArH); 7.88 (s, 1H, ArH); 7.67 (bs, 1H, NHCO); 7.58-7.32 (m, 7H, naphthalene); 6.85 (d, 1H, ArH); 3.49 (q, 2H, *J*=6.9 Hz, CH₂NH); 3.06 (s, 2H, COCH₂); 2.53 (bs, 4H, Pip); 1.65 (m, 6H, Pip); 1.33 (m, 2H, *J*=6.9 Hz, CH₂CH₂NH); 1.22 (m, 2H, *J*=7.9 Hz, CH₂CH₃); 0.75 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, CH₂CH₃).

N-etil-2-(4-isopropilfenossi)-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)benzamide (33): resa 87%, m.p. 65-67 °C, ESI-MS: 424.4 [M+H]⁺. Anal. (C₂₅H₃₃N₃O₃): C, 70.81; H, 7.82; N, 9.93. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)
δ: 9.36 (bs, 1H, CONH); 8.17 (dd, 1H, ArH); 7.88 (s, 1H, ArH); 7.74 (bs,

1H, NHCO); 7.23 (d, 2H, ArH); 6.95 (d, 2H, ArH); 6.85 (d, 1H, ArH); 3.49 (qt, 2H, $J=6.9$ Hz, -CH₂NH); 3.05 (s, 2H, COCH₂); 2.95 (m, 1H, CH-Isopropyl); 2.52 (bs, 4H, Pip); 1.64 (m, 6H, Pip); 1.26 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 1.24 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 1.18 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

N-esil-2-(4-isopropilfenossi)-5-(2-(piperidin-1-il)acetamido)benzamide (34):

resa 75%, m.p. 50-51 °C, ESI-MS: 480.5 [M+H]⁺. Anal. (C₂₉H₄₁N₃O₃): C, 72.69; H, 8.68; N, 8.77. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.37 (bs, 1H, CONH); 8.18 (dd, 1H, ArH); 7.87 (s, 1H, ArH); 7.78 (bs, 1H, NHCO); 7.22 (d, 2H, $J=2.9$ Hz, ArH); 6.94 (d, 2H, $J=7.9$ Hz, ArH); 6.86 (d, 1H, ArH); 3.43 (q, 2H, CH₂NH); 3.05 (s, 2H, COCH₂); 2.94 (m, 1H, CH-Isopropyl); 2.52 (bs, 4H, Pip); 1.64 (m, 6H, Pip); 1.53 (m, 8H, 4CH₂, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃); 1.25 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 1.24 (s, 3H, CH₃-Isopropyl); 0.83 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, CH₂CH₃).

3.4 Materiali

Tutti i reagenti, il composto di partenza della sintesi, le ammine e gli alcoli o i fenoli utilizzati, sono commercialmente disponibili da Aldrich. Tutte le reazioni descritte sono state monitorate mediante cromatografia su strato sottile (TLC), usando lastre di gel di silice del tipo

preconfezionato della Merck Kieselgel 60 F-254 con indicatore di fluorescenza, di dimensioni 5x10 cm, come eluente miscele di opportuni solventi, e come metodo di visualizzazione una lampada UV (254 nm), o, se opportuno, spruzzando successivamente le lastre con una soluzione di ninidrina in etanolo. I prodotti finali e alcuni intermedi sono stati ottenuti in forma pura mediante cromatografia su colonna utilizzando come fase stazionaria gel di silice (0,05-0,20 mm/70-230 mesh ASTM, Carlo Erba) e come eluente miscele di diversi solventi. Le soluzioni sono state anidificate mediante Na_2SO_4 o MgSO_4 anidro, e concentrate mediante rotavapor Buchi a bassa pressione.

4. FARMACOLOGIA

I composti **1-34** sono stati sottoposti a sperimentazione farmacologica presso il Centro di ricerca per le Neuropatologie e le Malattie da Prioni dell'Università "Ludwig-Maximilians" di Monaco di Baviera, in Germania. In prima analisi, è stato effettuato un saggio HTS basato sulla scansione di *target* intensamente fluorescenti (SIFT, *Scanning for Intensely Fluorescent Targets*), al fine di valutare la capacità dei composti in esame di interferire con l'interazione PrP^C/PrP^{Sc} a livello molecolare, inibendo pertanto il legame della PrP^C agli aggregati di PrP^{Sc}. Successivamente è stata valutata la loro capacità di inibire la propagazione di PrP^{Sc} in sistemi cellulari costituiti da cellule di neuroblastoma murino (ScN₂A) e cellule di cervello di topo (*scrapie-mouse-brain-cells-SMB*), infettate con PrP^{Sc}.

4.1 SIFT (*Scanning for Intensely Fluorescent Targets*)

La tecnica SIFT è una metodica di diagnostica molecolare che analizza le fluttuazioni del segnale di fluorescenza, emesso da molecole marcate con sonde fluorescenti, che diffondono all'interno di un volume di controllo microscopico, illuminato da un laser. Il fascio del laser viene concentrato su un elemento spaziale il più piccolo possibile il cui limite è

dato dalla lunghezza d'onda. Poiché il volume di controllo è di circa 1 femtolitro, è possibile esaminare la diffusione di particelle nel raggio del laser su scala molecolare. In questa tecnica, l'intensità di fluorescenza è legata al numero di particelle fluorescenti presenti nel volume di controllo, pertanto, tramite la funzione di correlazione delle fluttuazioni di tale segnale nel tempo, è possibile evidenziare la dinamica molecolare del diffondente fluorescente nel mezzo in esame. Un detector rivela le fluttuazioni temporali di fluorescenza, la cui correlazione contiene informazioni sulle proprietà diffusive dei fluorofori, ossia delle molecole capaci di dare il segnale di fluorescenza. Il tempo medio di permanenza di una molecola nel raggio del laser dipende dalle sue dimensioni. Se una molecola piccola e marcata con una sonda fluorescente si lega ad una molecola più grande, il complesso formatosi rallenta durante la sua diffusione attraverso il raggio del laser, ed emette fotoni per un tempo maggiore, pertanto la luce sarà più intensa. Se però il complesso formatosi supera le dimensioni ammesse dal volume di controllo, tale molecola, pur essendo marcata, non verrà rivelata dal detector. Pertanto, conoscendo il tempo di diffusione della molecola attraverso il volume di controllo, è possibile risalire alle sue dimensioni e, conoscendo il numero

di molecole marcate che passa nel raggio del laser nell'unità di tempo, è possibile risalire alla concentrazione del campione.

L'apparecchiatura consiste di un microscopio a fluorescenza confocale molto sensibile, con analisi computerizzata dei segnali correlati. Essa permette non solo di rendere visibili singole molecole, ma anche di rivelare concentrazioni minime corrispondenti ad un miliardo circa di particelle per litro. La tecnica SIFT è una delle più sensibili perché, a differenza delle altre tecniche spettroscopiche, utilizza un microscopio confocale invertito a doppio colore, cioè, invece di analizzare la fluorescenza proveniente da una singola molecola marcata, analizza la luce emessa da due molecole marcate con due coloranti fluorescenti diversi, per esempio, l'uno rosso e l'altro verde. Pertanto se la molecola in esame si legherà ad entrambe le sonde fluorescenti, non appena questo complesso ternario cadrà nel fuoco del laser, emergeranno contemporaneamente un intenso segnale rosso e uno verde. La loro coincidenza è un chiaro segno della presenza di quella molecola nel campione. L'efficacia di questo metodo diagnostico dipende proprio da questa correlazione incrociata.

4.1.1 Materiali e metodi per il saggio SIFT

La proteina ricombinante PrP 23-231 (rPrP) è stata prodotta e purificata come descritto da Bertsch et al. (64), fatta eccezione per l'espressione batterica delle cellule BL21(DE3) RIL di *Escherichia coli* (Novagen), che sono state trasformate con il plasmide pET17b-MmPrP23-231WT31 per PrP 23-231 di topo.

La PrP^{Sc} è stata estratta da cervelli umani di pazienti affetti da CJD, in accordo al metodo descritto da Bertsch et al. (64). Aliquote del *pellet* cellulare finale, risospese in un tampone fosfato (PBS), contenente una soluzione di sarcosina allo 0.1%, sono state diluite 1:5 in soluzione tampone A (fosfato di potassio 20 mM a pH 6.0, 0.1% Nonidet P-40), e sonicate per 60 secondi. Dopo centrifugazione a 1,000 rpm per 1 minuto, il surnatante è stato diluito 1:100 nel tampone A, utilizzato per il saggio.

Per le procedure di marcatura fluorescente si sono utilizzati anticorpi monoclonali L42 (MAb; r-biopharm, Darmstadt, Germany) diretti contro la PrP umana, marcati con una sonda intensamente colorata in rosso del tipo Alexa Fluor 647 (Alexa-647; Invitrogen, Eugene), in accordo alle procedure di manifattura. La proteina rPrP di topo è stata marcata con una sonda intensamente colorata in verde del tipo Alexa Fluor 488

(Alexa-448; Invitrogen, Eugene), in soluzione tampone A e bicarbonato di sodio 40 mM a pH 8.3. I fluorofori non legati sono stati separati mediante gel filtrazione su colonne PD10 (GE Healthcare, Freiburg, Germany), equilibrate con la soluzione tampone A. Il monitoraggio delle reazioni di marcatura e la valutazione delle rese sono stati effettuati mediante misure di spettroscopia di correlazione della fluorescenza (*FCS-Fluorescence Correlation Spectroscopy*) con lettore Insight Reader (Evotec Technologies, Hamburg, Germany). La percentuale di marcatura è risultata approssimativamente di 1,3 fluorofori per molecola di rPrP.

Molecole di rPrP di topo marcata e di anticorpo monoclonale L42 marcato, in quantità approssimativamente uguali di circa 2-7 nM, sono state riunite nella soluzione tampone A.

I composti in esame (**1-34**) sono stati diluiti 1:10 in DMSO e successivamente diluiti nuovamente 1:10, con la soluzione tampone A.

Un volume di 8 μ L di miscela rPrP/anticorpo è stato aggiunto a 2 μ L di soluzione contenente il composto in esame e a 10 μ L di soluzione contenente PrP^{Sc}, fino ad un volume totale di 20 μ L. I campioni così preparati sono stati caricati in 96 pozzetti con tappo in vetro (Evotec

Technologies, Hamburg, Germany), e sottoposti a misurazione della fluorescenza su lettore Insight Reader.

Le analisi della distribuzione dell'intensità di fluorescenza (*FIDA measurements*) sono state effettuate ad una energia di eccitazione di 200 μW per il laser da 488 nm, e di 300 μW per il laser da 633 nm. I parametri di scansione sono stati settati a 100 μm per la lunghezza del percorso di scansione, 50 Hz per la frequenza del raggio e 2000 μm per i movimenti della tavola di posizionamento del microscopio. Il tempo di misurazione è stato impostato a 10 secondi.

La luce fluorescente proveniente dai due fluorofori, presenti in ciascun campione, è stata misurata separatamente mediante un rivelatore a singolo fotone, e i fotoni incidenti sono stati sommati in un intervallo di tempo di lunghezza costante di 40 μs . Il numero di fotoni fluorescenti rossi e verdi è stato valutato mediante un diagramma di distribuzione dell'intensità di fluorescenza bidimensionale, come descritto da Bieschke et al. (66). I valori di intensità di fluorescenza sono stati calcolati utilizzando un software 2D-SIFT (Evotec Technologies, Hamburg,

Germany). I valori *cut-off* per ciascuna serie di misure sono stati modificati manualmente in accordo alle misurazioni dei controlli.

4.2 Inibizione dell'accumulo di PrP^{Sc} in modelli cellulari

Cellule di neuroblastoma murino (ScN₂a) e di cervello di topo (SMB), infettate stabilmente con il ceppo *scrapie* RML (Rocky Mountain Laboratory), sono state piastrate in quantità di 20.000 cellule per pozzetto in 100 µl di terreno di coltura, in una piastra a fondo piatto a 96 pozzetti Costar 3599 (Corning Inc., Corning, N.Y.). I composti in esame sono stati aggiunti al mezzo di coltura in una diluizione finale rispettivamente di 20,0 µl e 2,0 µl. Dopo un periodo di incubazione di tre giorni, alla temperatura di 37 °C per le cellule ScN₂a, e di 35 °C per le cellule SMB, in un incubatore a CO₂, le cellule sono state lisate e si è valutata la formazione degli aggregati di PrP^{Sc}. Dopo la rimozione del mezzo di coltura, 100 µl di buffer di lisi (TrisHCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM; 0,5% (p/v) DOC; 0,5% (v/v) Triton X-100) sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, per un tempo di 5 minuti a temperatura ambiente. In un apparato per dot-blotting (Sigma-Aldrich), il lisato cellulare è stato

trasferito sotto vuoto su una membrana attivata di fluoruro di polivinilidene (PVDF), (Immobilon-P; Milipore), e fissato ad essa mediante incubazione per 1 ora a 37°C. La membrana è stata successivamente trattata con proteinasi K (25 µg/ml) per 90 minuti a 37°C. In seguito, è stata lavata per due volte con acqua pura, poi trattata con una soluzione denaturante (guanidino tiocianato 3M, TrisHCl 0,1M, pH 8.0) per 10 minuti a temperatura ambiente, e infine lavata nuovamente per 5 volte con acqua pura. Dopo la denaturazione la membrana è stata bloccata con latte scremato 0.1% tween-20 (Sigma) al 5% (p/v), in un tampone fosfato (PBS-T) per 60 minuti. Successivamente è stata incubata con una soluzione diluita di anticorpi policlonali di coniglio (Groschup et al.) (67) per 60 minuti. Dopo la rimozione del tampone PBS-T, la membrana è stata incubata con una soluzione di 2 µg/ml di Horseradish perossidasi (HRP) coniugata con anticorpo di coniglio anti-IgG (Promega), il tutto in una soluzione di latte e PBS-T, per 1 ora a temperatura ambiente. Rimosso il tampone PBS-T, gli anticorpi legati sono stati visualizzati utilizzando reagenti chemiluminescenti (ECL, Amersham), e tramite un sistema digitale di analisi diretta delle immagini in chemioluminescenza (Versa Doc,

Quantity One, Bio-Rad, Munich, Germany). L'inibizione è stata calcolata sottoforma di volume del segnale relativo ai composti, comparato ai controlli non trattati (100%).

5 RISULTATI E DISCUSSIONE

La tecnica SIFT è stata applicata per testare l'effetto inibitorio dei composti **1-34** sull'associazione tra PrP^C e PrP^{Sc}. Sono stati innanzitutto preparati dei campioni di controllo costituiti da una miscela di frammenti della proteina prionica ricombinate di topo (rPrP 23-231), marcati con una sonda radioattiva intensamente colorata in verde (Alexa 488 dye), e molecole di un anticorpo monoclonale L42 (MAb) attivo contro la proteina prionica umana ma non di topo, marcati con una sonda radioattiva intensamente colorata in rosso (Alexa 647 dye). A questa miscela sono stati successivamente aggiunti aggregati di PrP^{Sc} non marcati, estratti da cervelli umani affetti da CJD. Accanto ai controlli sono stati poi preparati dei campioni contenenti anche i composti in esame **1-34**, scegliendo come composto di riferimento per lo *screening* un catione lipidico, 2,3-dioleoilossi-N-[2(sperminocarbossammide)etil]-N,N-dimetil-1-propanamminio trifluoroacetato (DOSPA), che precedentemente saggiato, si è dimostrato in grado di inibire notevolmente l'accumulo di PrP^{Sc} su colture cellulari e di indurre una forte diminuzione del legame tra PrP^C e PrP^{Sc} a concentrazioni micro molari (64, 65). Come è illustrato nella figura 14A, dall'analisi dei controlli è risultato che diverse molecole di proteina prionica ricombinate

di topo (rPrP 23-231) e dell'anticorpo monoclonale MAb L42 si legano agli aggregati di PrP^{Sc}, in quanto si formano dei complessi ternari contenenti molti fluorofori rossi e verdi, che rimangono per un tempo maggiore nel focus del laser. Questi aggregati possono essere analizzati nel diagramma di intensità di fluorescenza bidimensionale (Fig. 14C), in cui sull'asse delle ascisse è riportata l'intensità dei lampi di fluorescenza verdi mentre sull'asse delle ordinate, l'intensità dei lampi di fluorescenza rossi. Dal diagramma emerge che i segnali a bassa intensità di fluorescenza delle molecole marcate sono separati da segnali di aggregati aspecifici che incorporano solo un tipo di etichetta colorata, invece i segnali ad alta intensità di fluorescenza si distribuiscono uniformemente in entrambi i settori rosso e verde. L'analisi invece dei campioni contenenti anche i composti in esame, ha mostrato, per molti dei derivati **1-34**, una netta diminuzione dell'intensità di fluorescenza verde degli aggregati ternari (Fig. 14B), a dimostrazione del fatto che i composti in esame inibiscono l'associazione tra rPrP 23-231 e PrP^{Sc}, sequestrando molecole di rPrP che, staccandosi dal complesso con l'anticorpo e con gli aggregati di PrP^{Sc}, si legano al composto. Dalla figura 14D si nota che

diminuisce l'intensità dei lampi fluorescenti di colore verde e i segnali ad alta intensità si spostano tutti dal settore verde al settore rosso.

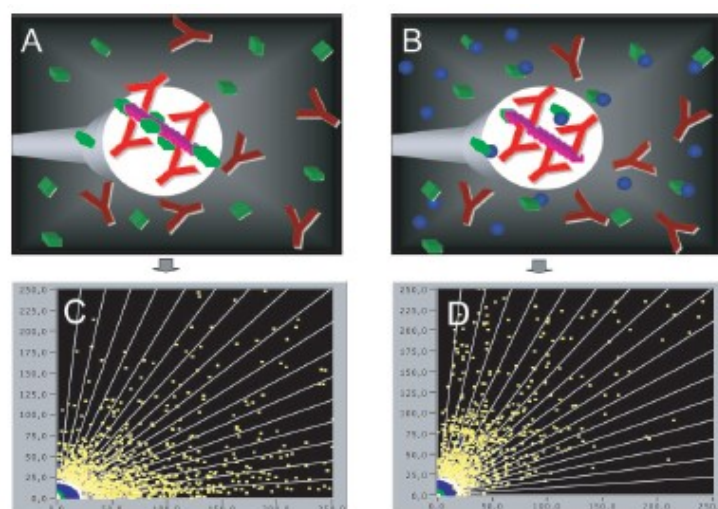


Figura 14. Rappresentazione schematica dei componenti del saggio senza e con i composti ad attività antiprionica. (A e B). L'anticorpo contro la PrP umana è rappresentato come una Y rossa, la rPrP di topo è rappresentata da cubi verdi, gli aggregati di PrP^{Sc} umana sono rappresentati da catenelle di colore rosa, i composti ad attività antiprionica sono rappresentati da palline blu, il cerchio bianco rappresenta il focus del laser usato per la scansione della miscela del saggio. (C e D) diagramma di intensità di fluorescenza in due dimensioni senza e con i composti ad attività antiprionica, rispettivamente.

Per quantificare la riduzione di PrP^C causata dai differenti composti, il relativo ammontare della proteina, presente nei campioni di controllo, è stato settato al 100%. In questo modo si sono ottenute le curve concentrazione-effetto relative alla percentuale di PrP^C presente nei

campioni, in funzione della concentrazione μM del composto. Tali curve ci hanno permesso di calcolare la EC_{50} per i composti **1-34** (Tab. 3 e 4).

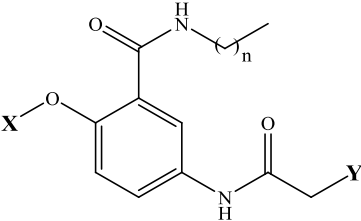
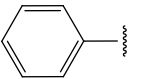
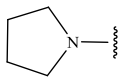
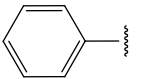
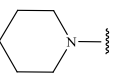

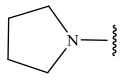

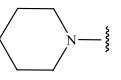
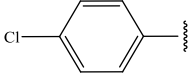
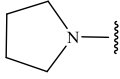
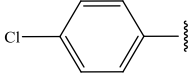
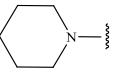
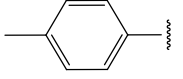
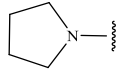
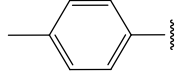
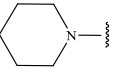
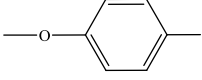
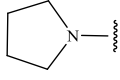
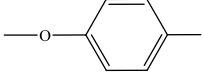
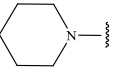
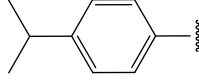
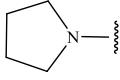
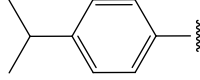
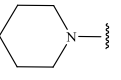
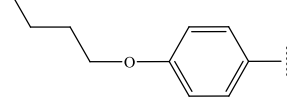
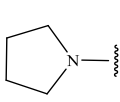
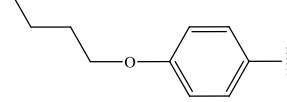
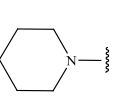
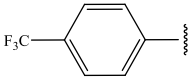
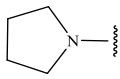
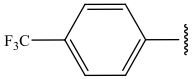
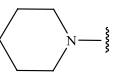
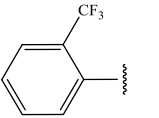
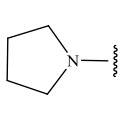
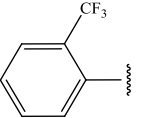
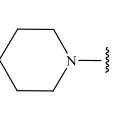
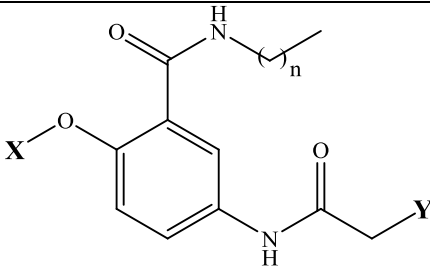
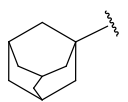
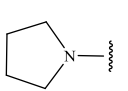
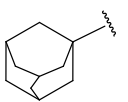
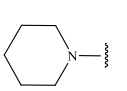
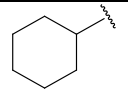
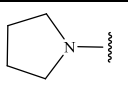
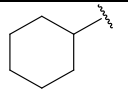
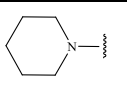

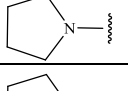

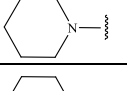

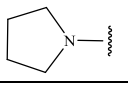

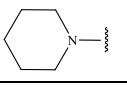
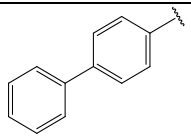
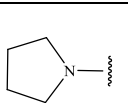
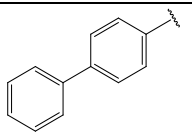
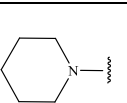
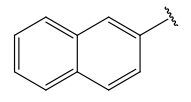
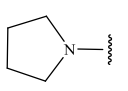
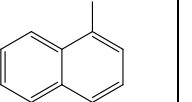
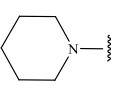
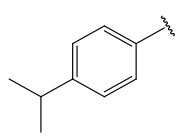
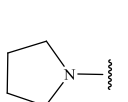
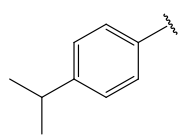
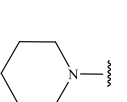
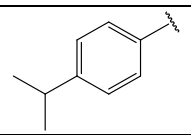
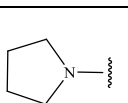
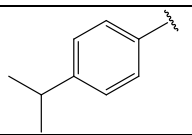
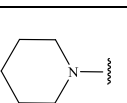
Tabella 3. Risultati SIFT composti 1-18									
									
N°	X	Y	n	SIFT EC ₅₀ (μM)	N°	X	Y	n	SIFT EC ₅₀ (μM)
1			3	200	10			3	200
2			3	200	11			3	70
3			3	55	12			3	20
4			3	70	13			3	40
5			3	180	14			3	150
6			3	18	15			3	15
7			3	30	16			3	50
8			3	40	17			3	70
9			3	25	18			3	70

Tabella 4. Risultati SIFT composti 19-34

									
N°	X	Y	n	SIFT EC ₅₀ (μM)	N°	X	Y	n	SIFT EC ₅₀ (μM)
19			3	80	27			3	50
20			3	200	28			3	80
21			3	inactive	29			3	inactive
22			3	inactive	30			3	inactive
23			3	50	31			3	40
24			3	20	32			3	43
25			1	45	33			1	55
26			5	60	34			5	57

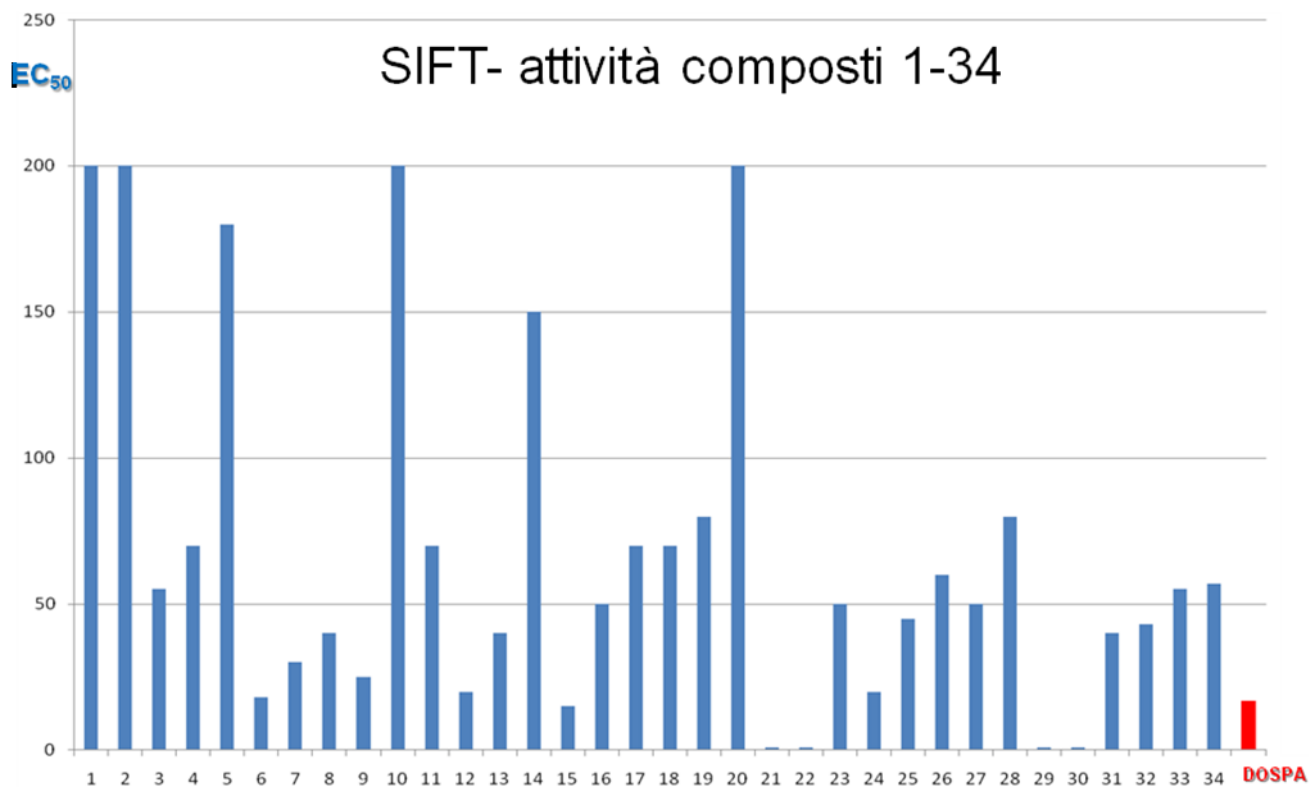


Figura 15. Attività dei composti **1-34** valutata mediante saggio SIFT

Dall'analisi dei risultati relativi al saggio SIFT (Tab. 3 e 4, Fig. 15), si evince che la gran parte dei prodotti sintetizzati ha mostrato un'alta affinità nei confronti della proteina prionica. Alcuni derivati si sono rivelati poco o pochissimo affini, ma solo 4 sono risultati non affini. In particolare, i composti più interessanti sono risultati **6, 9, 12, 15 e 24**, i

quali hanno mostrato i valori più bassi di EC_{50} , compresi tra 15 e 25 μM , quindi di poco differenti dal composto di riferimento DOSPA (17 μM), che è risultato addirittura meno affine del composto **15** (15 μM). La maggioranza dei composti in esame ha mostrato una buona affinità, con valori di EC_{50} inferiori a 60 μM . I composti che hanno fornito i più alti valori di EC_{50} sono risultati **1**, **2**, **10** e **20** (200 μM), mentre i composti **21**, **22**, **29** e **30**, sembrano i soli a non mostrare nessuna affinità di legame per il *target* proteico. Osservando i dati sperimentali abbiamo dedotto che, ai fini del *binding*, è importante mantenere nella molecola un sostituito X (vedi struttura generale dei composti **1-34**, tabelle 1 e 2), che abbia precise caratteristiche steriche, elettroniche e idrofobiche. Pare infatti che, in questa specifica porzione della molecola, un centro aromatico, rigido, stericamente ingombrato e eventualmente dotato di un sostituito elettronattrattore, favorisca un forte legame con la proteina. Ciò si evince infatti dai risultati relativi al composto **24**, che presenta un anello β -naftilico in posizione X, ai composti **6** e **15**, in cui è presente un isopropile legato al nucleo fenossibenzammidico, e ai composti **9** e **12**, che presentano un sostituito fortemente elettronegativo, rispettivamente

il trifluorometile e il cloro, legato all'anello aromatico. L'ipotesi strutturale formulata è confermata dal fatto che i derivati meno affini sono quelli che mancano di un sostituyente rigido e ingombrante sull'anello aromatico (**1**, **2**, **10** e **20**), mentre quelli che presentano un sostituyente X non aromatico e caratterizzato da un minor ingombro sterico (composti **21**, **22**, **29** e **30**), risultano completamente non affini. Per la maggior parte dei composti, le dimensioni del ciclo che racchiude l'unico centro basico della molecola, non sembrano influenzare molto l'interazione con la proteina, dato che i derivati pirrolidinici e piperidinici presentano un profilo di affinità molto simile, fatta eccezione per i composti **9/18**, **2/11**, e **20/28**, per i quali il legame alla proteina sembra piuttosto influenzato dalla presenza dell'opportuna ammina ciclica. Infine, dal saggio SIFT è risultato che la lunghezza della catena alchilica legata all'anello aromatico per mezzo di un legame carbossiammidico, non sembra determinante ai fini del *binding*, in quanto l'affinità dei derivati butilici è paragonabile a quella dei derivati etilici o esilici.

In definitiva, l'affinità verso la proteina prionica, delle molecole da noi progettate e sintetizzate, sembra quindi derivare solo da una precisa combinazione delle diverse proprietà steriche ed elettroniche dei vari

sostituenti alifatici e aromatici, legati al nucleo 5-ammino salicilico, in comune a tutti i composti.

I saggi sulle linee cellulari sono stati condotti utilizzando come molecola di riferimento GN8 che è stata incubata, così come i composti **1-34**, a due differenti valori di concentrazione, ossia 20 e 2 μ M. Dall'analisi dei risultati (Tab. 5 e 6, Fig. 16 e 17), abbiamo riscontrato che le cellule di neuroblastoma murino (ScN2a) rispondono meglio ai composti saggiati rispetto alle cellule SMB. In particolare, i composti più attivi sulle cellule ScN2a sono risultati **3, 6, 8, 9, 12, 24 e 27**, che, alla minima concentrazione testata di 2 μ M, hanno mostrato una percentuale di aggregati di PrP^{Sc} presenti, compresa tra il 16 e il 35%, quindi in alcuni casi (composti **9 e 24**), addirittura inferiore a quella relativa al composto di riferimento GN8 (25%). I composti meno attivi sono risultati **26, 29, 30 e 34**, che hanno mostrato i valori più alti di percentuale di PrP^{Sc}, compresi tra il 76 e il 94%.

Per quanto riguarda le cellule SMB, i composti più attivi si sono rivelati **24, 31 e 32** in quanto hanno fornito percentuali di PrP^{Sc}, alla minima concentrazione testata (2 μ M), rispettivamente del 40, 41 e 31%,

in tutti i casi inferiori a quelle mostrate da GN8 (44%), mentre i meno attivi, con percentuali di PrP^{Sc} superiori all'80%, sono risultati **1**, **2**, **13** e **14**.

I saggi sulle linee cellulari ci hanno permesso di confermare quanto ipotizzato con il saggio SIFT, in quanto i composti più attivi sono risultati in tutti i casi quelli dotati di un nucleo aromatico, rigido, lipofilo e stericamente ingombrato, eventualmente sostituito con un atomo di cloro o un gruppo trifluorometilico. Abbiamo inoltre riscontrato che le dimensioni del ciclo che racchiude il centro basico della molecola, che come evidenziato nel saggio SIFT per alcuni composti (**2/11**, **9/18** e **20/28**), possono essere influenti nel legame con la proteina, risultano in realtà poco importanti per l'attività sulle cellule, in quanto non c'è una differenza significativa tra i derivati pirrolidinici e piperidinici. Per quanto riguarda la lunghezza della catena alchilica legata all'anello aromatico, dai risultati sulle cellule si evince che i derivati esilici (**26** e **34**) presentano un basso profilo di attività, probabilmente a causa della loro minore solubilità.

Tabella 5. Attività dei composti 1-18 su colture cellulari.									
	SMB 20 µM %PrP^{Sc}		SMB 2 µM %PrP^{Sc}		ScN2a 20 µM %PrP^{Sc}			ScN2a 2 µM %PrP^{Sc}	
GN8	37%		44%		13%			25%	
N°	SMB 20 µM %PrP^{Sc}	SMB 2 µM %PrP^{Sc}	ScN2a 20 µM %PrP^{Sc}	ScN2a 2 µM %PrP^{Sc}	N°	SMB 20 µM %PrP^{Sc}	SMB 2 µM %PrP^{Sc}	ScN2a 20 µM %PrP^{Sc}	ScN2a 2 µM %PrP^{Sc}
1	82%	92%	41%	48%	10	75%	65%	30%	50%
2	92%	57%	39%	45%	11	81%	61%	32%	35%
3	46%	68%	16%	25%	12	49%	68%	21%	35%
4	55%	61%	13%	32%	13	86%	86%	26%	36%
5	75%	74%	31%	36%	14	82%	83%	28%	49%
6	48%	73%	20%	32%	15	46%	72%	13%	43%
7	58%	82%	19%	52%	16	52%	76%	21%	61%
8	41%	50%	12%	26%	17	53%	80%	17%	35%
9	54%	61%	15%	16%	18	55%	75%	12%	39%

Tabella 6. Attività dei composti 19-34 su colture cellulari.									
	SMB 20 µM %PrP^{Sc}		SMB 2 µM %PrP^{Sc}		ScN2a 20 µM %PrP^{Sc}			ScN2a 2 µM %PrP^{Sc}	
GN8	37%		44%		13%			25%	
N°	SMB 20 µM %PrP^{Sc}	SMB 2 µM %PrP^{Sc}	ScN2a 20 µM %PrP^{Sc}	ScN2a 2 µM %PrP^{Sc}	N°	SMB 20 µM %PrP^{Sc}	SMB 2 µM %PrP^{Sc}	ScN2a 20 µM %PrP^{Sc}	ScN2a 2 µM %PrP^{Sc}
19	42%	77%	16%	34%	27	36%	54%	12%	27%
20	38%	67%	32%	38%	28	65%	76%	22%	37%
21	65%	74%	32%	53%	29	66%	70%	37%	76%
22	48%	59%	24%	42%	30	72%	58%	29%	78%
23	36%	72%	21%	45%	31	33%	41%	18%	49%
24	32%	40%	18%	23%	32	26%	31%	30%	48%
25	54%	36%	32%	36%	33	58%	55%	26%	41%
26	62%	52%	30%	82%	34	63%	53%	28%	94%

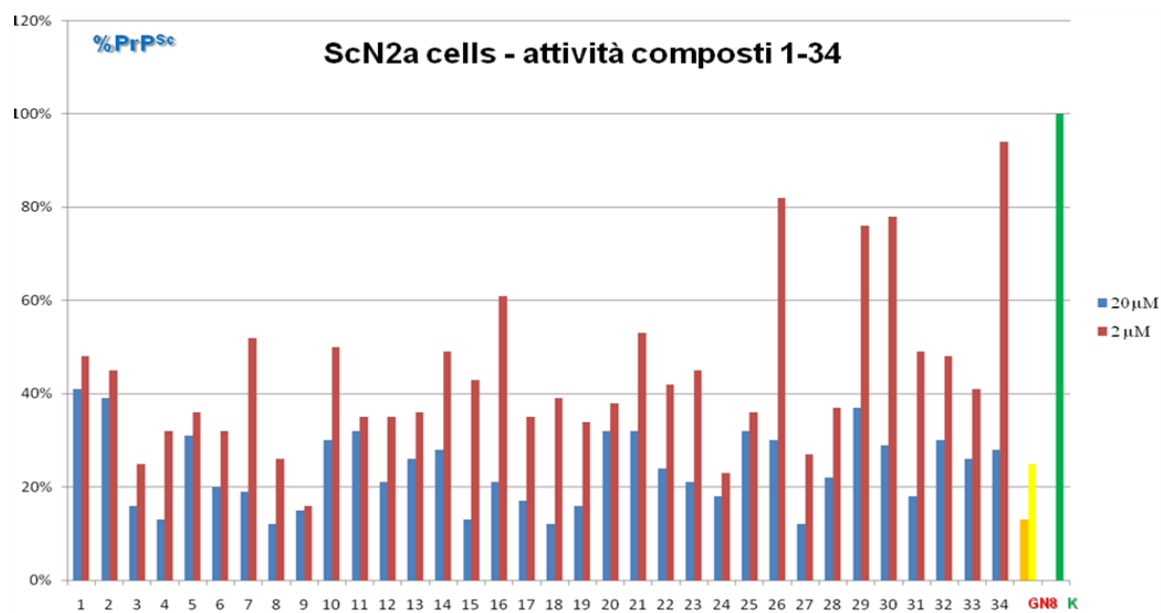


Figura 16. Attività dei composti 1-34 sulle cellule ScN2a.

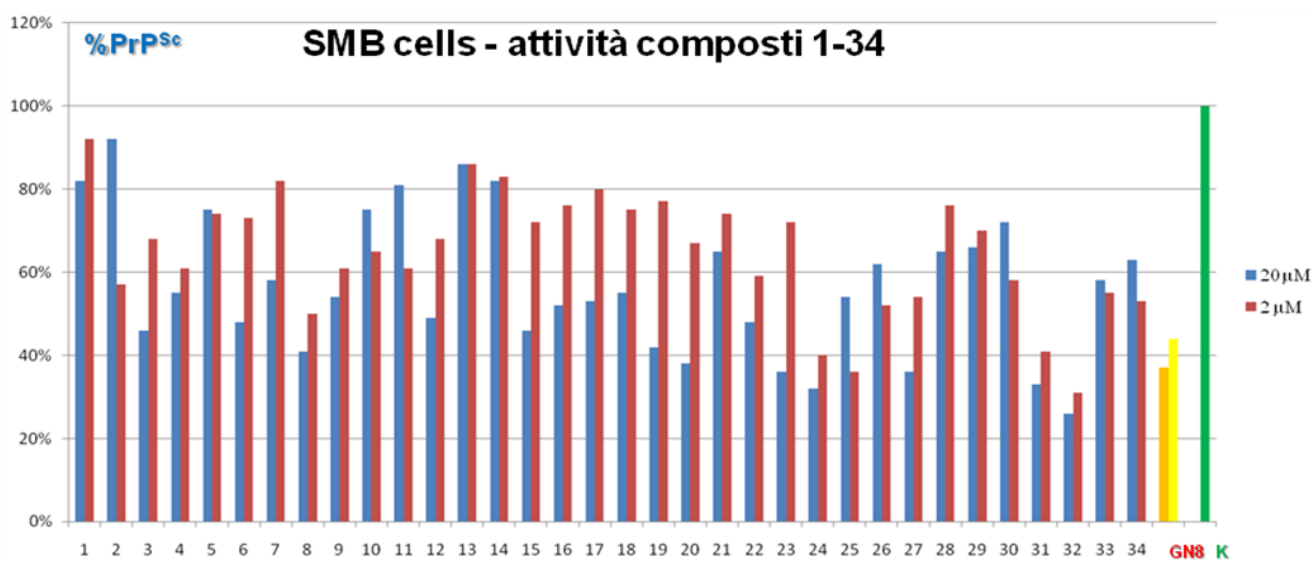


Figura 17. Attività dei composti 1-34 sulle cellule SMB.

Da un'analisi globale dei dati ottenuti, abbiamo riscontrato che per la maggior parte dei composti sintetizzati esiste una chiara correlazione tra i risultati del saggio SIFT e quelli sulle linee cellulari. Tale constatazione ci permette di fare delle ipotesi circa il loro meccanismo d'azione; infatti, se i composti che mostrano la migliore capacità di legarsi alla proteina prionica, risultano poi anche i più attivi nell'inibire la propagazione di PrP^{Sc} nei sistemi cellulari, allora è possibile confermare quanto postulato dalla *teoria prionica*, in quanto tali molecole agirebbero effettivamente da inibitori della conversione della PrP^C in PrP^{Sc}.

Per alcuni composti non abbiamo riscontrato questa concordanza dei risultati dei due tipi di saggio. Alcune molecole, infatti, si sono rivelate molto affini alla proteina prionica dal saggio di fluorescenza, ma non hanno poi mostrato la maggiore attività sulle cellule (composti **6** e **15**). Molto probabilmente tali molecole hanno la capacità di legarsi alla proteina, ma non sono poi in grado di inibire la sua conversione nella forma patogena, sono pertanto affini ma non attive. Viceversa, per le molecole che sono risultate attive sulle cellule ma poco affini alla proteina prionica è possibile ipotizzare un meccanismo d'azione diverso.

Possiamo supporre che tali composti abbiano una minore affinità per la proteina prionica in forma cellulare (PrP^C), non riuscendo a staccare la rPrP marcata dal complesso ternario con la PrP^{Sc} e l'anticorpo, mentre risultino molto affini alla proteina in forma patogena (PrP^{Sc}), presente nel modello cellulare, che è conformazionalmente diversa dalla PrP^C.

I dati sperimentali ottenuti si sono rivelati significativi e molto incoraggianti, pertanto i composti che si sono dimostrati più attivi in entrambi i saggi, sono stati selezionati e sono attualmente sottoposti a sperimentazione in vivo su un modello animale di malattia prionica.

Con l'intento di effettuare una più adeguata e razionale valutazione delle relazioni struttura-attività dei composti sintetizzati, gli sviluppi futuri di questo progetto prevedono un dettagliato studio di *modeling molecolare* e di *docking*, allo scopo di individuare e studiare regioni chiave concernenti interazioni ligando-proteina sulle quali poi "modellare" anche nuove molecole con potenziale attività antiprionica.

Concludendo, gli interessanti risultati ottenuti con i composti **1-34** sintetizzati durante il mio lavoro di Dottorato di Ricerca, hanno permesso di identificare dei nuovi *lead compounds* utili alla definizione dei requisiti strutturali necessari per l'interazione con la proteina prionica.

Poiché attualmente, in letteratura, non sono stati ancora descritti composti antiprionici potenti ed efficaci e con una SAR dettagliata e ben definita, qualora i derivati **1-34** dovessero risultare attivi anche nel modello animale, una volta definite in maniera approfondita le relazioni struttura-attività, avremmo identificato una nuova serie di molecole dotate di una potente attività antiprionica, che potrebbero avere una reale applicazione nel trattamento delle malattie da prioni, sia negli uomini che negli animali, per le quali purtroppo fino ad oggi non esiste ancora alcuna terapia efficace.

BIBLIOGRAFIA

1. Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*; 216: 136-144.
2. Prusiner, S.B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*; 252(5012): 1515 – 1522.
3. Huang Z., Prusiner S.B., and Cohen F.E. (1995). Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Folding & Design*, 1: 13–19.
4. K.M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90(23): 10962–10966.
5. Stanley B. Prusiner, Michael P. McKinley, Karen A. Bowman, David C. Bolton, Paul E. Bendheim, Darlene F. Groth and George G. Glenner. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*; 35(2): 349-358.
6. C.J. Gibbs, Jr., D.C. Gajdusek, D.M. Asher, M.P. Alpers, Elizabeth Beck, P.M. Daniel and W.B. Matthews. (1968). Creutzfeldt-Jakob Disease (Spongiform Encephalopathy): Transmission to the Chimpanzee. *Science*; 161(3839): 388-389.
7. Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* ; 95, 13363-13383.
8. DC Gajdusek. (1977). Unconventional viruses and the origin and

disappearance of kuru. *Science*; 197: 943-960.

9. Prusiner, S.B. (1989). Scrapie Prions. *Annual Review of Microbiology* ; 43: 345-374.
10. K. Hsiao, Z. Meiner, E. Kahana, C. Cass, I. Kahana, D. Avrahami, G. Scarlato, O. Abramsky, S.B. Prusiner and R. Gabizon. (1991). Mutation of the Prion Protein in Libyan Jews with Creutzfeldt–Jakob Disease. *N Engl J Med*; 324(16): 1091-1097.
11. P. Brown, F. Cathala, R.F. Raubertas, D.C. Gajdusek and P. Castaigne. (1987). The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology*; 37(6): 895-904.
12. N. Paul Rosenthal, John Keeseey, Barbara Crandall, W. Jann Brown. (1976). Familial Neurological Disease Associated With Spongiform Encephalopathy. *Arch Neurol*; 33(4): 252-259.
13. E. Lugaresi, R. Medori, P. Montagna, A. Baruzzi, P. Cortelli, A. Lugaresi, P. Tinuper, M. Zucconi and P. Gambetti. (1986). Fatal Familial Insomnia and Dysautonomia with Selective Degeneration of Thalamic Nuclei. *N Engl J Med*; 315: 997-1003.
14. L. G. Goldfarb, P. Brown, E. Mitrovà, L. Cervenáková, L. Goldin, A. D. Korczyn, J. Chapman, S. Galvez, L. Cartier and R. Rubenstein, et al. (1991). Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200LYS mutation: An analysis of 45 families. *European Journal of Epidemiology*; 7(5): 477-486.
15. R. G. Will, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman, E. Mitrova, et all. (1998). Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-

- Jakob disease in six european countries, 1993–1995. *Ann. Neurol.*; 43(6): 763–767.
16. P. Brown, M.A. Preece, R.G. Will. (1992). "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *The Lancet*; 340(8810): 24-27.
 17. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, et al. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*; 347: 921-5.
 18. B. Oesch, D. Westaway, M. Wälchli, M.P. McKinley, S.B.H. Kent, R. Aebersold, R.A. Barry, P. Tempst, D.B. Teplow, L.E. Hood, S.B. Prusiner and C. Weissmann, (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*; 40(4): 735-746.
 19. P. Parchi, R. Castellani, S. Capellari, B. Ghetti, K. Young, S.G. Chen, M. Farlow, D.W. Dickson, A.A.F. Sima, J.Q. Trojanowski, R.B. Petersen, P. Gambetti. (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic creudeldt-jakob disease. *Annals of Neurology*; 39(6): 767–778.
 20. Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, Mitrova E, de Pedro Cuesta J, Hegyi I, Collins S, Kretzschmar H, van Duijn C, Will RG. (1999). Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*; 353(9165): 1673-4.
 21. Weissman C. (1994). Molecular biology of prion diseases. *Trends in Cell Biology*; 4(1): 10-14.
 22. Brown P, Gibbs CJ Jr, Rodgers-Johnson P, Asher DM, Sulima MP, Bacote A, Goldfarb LG, Gajdusek DC. (1994). Human spongiform

- encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol*; 35(5): 513-29.
23. BY P. J. G. PLUMMER. (1946). Scrapie - A Disease of Sheep. *Canadian Journal of Comparative Medicine*; 10(2).
 24. Barlow RM. (1972). Transmissible mink encephalopathy: pathogenesis and nature of the aetiological agent. *J Clin Pathol Suppl* (R Coll Pathol); 6:102-9.
 25. Williams, E.S. and Young, S., (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: A spongiform encephalopathy. *J. Wildlife Diseases*; 16: 89-98.
 26. Bovine spongiform encephalopathy by Richard H. Kimberlin. Scrapie and Related Diseases. Advisory Service Edinburgh, UK.
 27. Bovine spongiform encephalopathy in a dairy cow — Washington state, 2003. *MMWR*. January 9, 2004; 52(53):1280-1285.
 28. Preliminary Investigation Suggests BSE-Infected Cow in Washington State Was Likely Imported from Canada. (Dec. 29, 2003).
 29. Probable Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a U.S. Resident-Florida, 2002. *MMWR*. October 18, 2002; 51(41): 927-929.
 30. Bovine Spongiform Encephalopathy and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease: Background, Evolution, and Current Concerns. *EID*. January-February 2001; 7(1): 6-16.
 31. Pearson, G.R.; Wyatt, J.M.; Gruffydd-Jones, T J.; Hope, J.; Chong, A.; Higgins, R.J.; Scott, A.C.; Wells, G.A.H. (1992). Feline spongiform encephalopathy: fibril and PrP studies. *Veterinary Record*; 131(14): 307-310.

32. Naudé, J te Water, C M Verity, R G Will, G Devereux, and L Stellitano. (2004.) "Is variant Creutzfeldt-Jakob disease in young children misdiagnosed as Alpers' syndrome? An analysis of a national surveillance study". *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*; 75: 910-913.
33. Aguzzi, A., Baumann, F. and Bremer, J. (2008). The prion's elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.*, 31, 439-477.
34. Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D.A. and Clarke, M.C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*; 214, 764-766.
35. Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P.T. and Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*; 370, 471-474.
36. Zanusso, G., Petersen, R.B., Jin, T., Jing, Y., Kanoush, R., Ferrari, S., Gambetti, P. and Singh, N. (1999). Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. *J. Biol. Chem.*; 274, 23396-23404.
37. Griffith, J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*; 215, 1043-1044.
38. Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A., Blättler, T., Fischer, M., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein (PrP^C) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 93(23): 13148-13151.
39. Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N. and Shinagawa, M.A. (1995). A cellular form of prion protein (PrP^C) exists in many

- non-neuronal tissues of sheep. *J. Gen. Virol.*; 76, 2583-2587.
40. Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A., Cammarota, M., Izquierdo, I. and Brentani, R.R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol. Rev.*; 88, 673-728.
 41. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. and Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121-231). *Nature*; 382, 180-182.
 42. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. and Wüthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP (23-231). *FEBS letters*; 413, 282-288.
 43. Lee, I. Y., Westaway, D., Smit, A.F.A., Wang, K., Seto, J., Chen, L., Acharya, C., Ankener, M., Baskin, D., Cooper, C., Yao, H., Prusiner, S.B. and Hood, L.E. (1998). Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res.*; 8, 1022-1037.
 44. Mahal, S.P., Asante, E.A., Antoniou, M. and Collinge, J. (2001). Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene*; 268(1-2), 105-114.
 45. Stahl, N. et al. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*; 32, 1991-2002.
 46. Abbott A. (2010). "Healthy prions protect nerves". *Nature*. doi:10.1038/news.2010.29.<http://www.nature.com/news/2010/100124/full/news.2010>.
 47. Chiarini, L.B., Freitas, A.R.O., Zanatta, S.M., Brentani, R.R.,

- Martins, V.R. and Linden, R. (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *The EMBO Journal*; 13, 3317-3326.
48. Criado, J.R., Sanchez-Alavez, M., Conti, B., Giacchino, J.L., Wills, D.N., Henriksen, S.J., Race, R., Manson, J.C., Chesebro, B. and Oldstone, M.B. (2005). Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol. Dis.*; 19, 255-265.
49. Kuwahara, C., Takeuchi, A.M., Nishimura, T., Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Yokoyama, T., Itohara, S. and Onodera, T. (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*; 400, 225-226.
50. Jochen W. Herms, Hans A. Kretzschmar¹, Stefan Titz, Bernhard U. Keller. (1995). Patch-clamp Analysis of Synaptic Transmission to Cerebellar Purkinje Cells of Prion Protein Knockout Mice. *European Journal of Neuroscience*; 7(12): 2508–2512.
51. Khosravani, H., Zhang, Y., Tsutsui, S., Hameed, S., Altier, C., Hamid, J., Chen, L., Villemaire, M., Ali, Z., Jirik, F.R. and Zamponi, G.W. (2008). Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *The J. Cell Biol.*; 181, 551-565.
52. I. Tobler, S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rüdlicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride & J. C. Manson. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*; 380, 639 - 642 .
53. Pauly, P.C. and Harris, D.A. (1998) Copper stimulates endocytosis of

- the prion protein. *J. Biol. Chem.*; 273, 33107-22110.
54. Hornshaw, M.P., McDermott, J.R. and Candy, J.M. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 207, 621-629.
 55. Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B. and Kretzschmar, H.A. (1997). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.*; 146, 104-112.
 56. Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. and Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*; 46, 417-428.
 57. Vital, C., Gray, F., Vital, A., Ferrer, X. and Julien, J. (1999). Prion disease with octapeptide repeat insertion. *Clin. Exp. Pathol.*; 47(3-4), 153-159.
 58. Collinge, J., Palmer, M.S. and Dryden, A.J. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeld-Jakob disease. *Lancet*; 337, 1441-1442.
 59. Mead, S., Mahal, S.P., Beck, J., Campbell, T., Farral, M., Fisher, E. and Collinge, J. (2001). Sporadic but not variant Creutzfeldt-Jakob disease is associated with polymorphisms upstream of PRNP Exon 1. *Am. J. Hum. Genet.*; 69, 1225-1235
 60. Cho, H.J. (1976). Is the scrapie agent a virus? *Science*; 262, 411-412.
 61. H. Ludewigs, C. Zuber, K. Vana, D. Nikles, I. Zerr and S. Weiss. (2007). Therapeutic approaches for prion disorders. *Exert Rev. Anti*

Infect. Ther.; 5(4):613-630.

62. Kazuo Kuwata, Noriyuki Nishida, Tomoharu Matsumoto, Yuji O. Kamatari, Junji Hosokawa-Muto, Kota Kodama, Hironori K. Nakamura, Kiminori Kimura, Makoto Kawasaki, Yuka Takakura, Susumu Shirabe, Jiro Takata, Yasufumi Kataoka, and Shigeru Katamine. (2007). Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. *PNAS*; 104(29): 11921-11926
63. Pawel P. Liberski. (2004). Prion protein as a target for therapeutic interventions. *Pure Appl. Chem.*, 76(5): 915–920.
64. Uwe Bertsch, Konstanze F. Winklhofer, Thomas Hirschberger, Jan Bieschke, Petra Weber, F. Ulrich Hartl, Paul Tavan, Joërg Tatzelt, Hans A. Kretzschmar, and Armin Giese. (2005). Systematic Identification of Antiprion Drugs by High-Throughput Screening Based on Scanning for Intensely Fluorescent Targets. *J Virol.*; 79(12): 7785–7791.
65. Ira Yudovin-Farber, Tony Azzam, Esther Metzger, Albert Taraboulos and Abraham J. Domb. (2005). Cationic Polysaccharides as Antiprion Agents. *J. Med. Chem.*; 48, 1414-1420.
66. J. Bieschke , A. Giese, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr, S. Poser, M. Eigen and H. Kretzschmar, (2000). Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *PNAS*; 97(10) 5468–5473.
67. Groschup MH, Harmeyer S, Pfaff E. (1997). Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species. *J. Immunol. Methods*; 207, 89-101.

68. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*; 73(7), 1339-1347.
69. Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita, Università degli Studi di Napoli, "Federico II" - Facoltà di Medicina e Chirurgia, Napoli, 25-26 Novembre 2010. Poster dal titolo: Sintesi e valutazione farmacologica di ligandi della proteina prionica per il loro impiego nel trattamento delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE). A. Esposito, B. Severino, F. Fiorino, M.P. Incisivo, F. Frecentese, E. Perissutti, A. Giese, J. Wagner, V. Santagada, G. Caliendo.